AUS D. UNIVERSITÄTS-POLIKLINIK F. HAUTKRANKHEITEN
ZU HALLE A. S. (DIREKTOR: PROF. DR. C. GROUVEN.)

DIE KULTUR DER SPIROCHAETE PALLIDA UND IHRE EXPERIMENTELLE VERWERTUNG.

HABILITATIONSSCHRIFT

ZUR ERLANGUNG DER VENIA LEGENDI IN DER DERMATOLOGIE UND SYPHILIDOLOGIE

VORGELEGT DER HOHEN MEDIZINISCHEN FAKULTÄT D. UNIVERSITÄT ZU HALLE A. S. VON

DR. H. SOWADE

1. ASSISTENT DER KÖNIGL. UNIV.-POLIKLINIK FUR HAUTKRANKHEITEN ZU HALLE A. S.

ACAD.
LUGD.BAT
BIBL.

SONDERABDRUCK
AUS DEM ARCHIV FÜR DERMATOLOGIE UND SYPHILIS
BAND CXIV, H. 1.

DRUCK VON A. HAASE, K. U. K. HOFBUCHDRUCKER IN PRAG.

Verlag
von
WILHELM BRAUMÜLLER, k. u. k. Hof- und Univers.-Buchhändler
Wien und Leipzig.

ARCHIV

für

Dermatologie und Syphilis.

Begründet von **H. Auspitz** und **F. J. Pick.**

Unter Mitwirkung von

AMICIS (Neapel), ARNDT (Berlin), ARNING (Hamburg), BEHREND (Berlin), BETTMANN (Heidelberg), BLASCHKO (Berlin), BLOCH (Basel), BOECK (Christiania), BRUCK (Breslau), BRUHNS (Berlin), BUSCHKE (Berlin), CEDERCREUTZ (Helsingfors), DUHRING (Philadelphia), EHLERS (Kopenhagen), EHRMANN (Wien), FABRY (Dortmund), GALEWSKY (Dresden), GIOVANNINI (Turin), GROSZ (Wien), GROUVEN (Halle), GRÜNFELD (Odessa), HALLOPEAU (Paris), HAMMER (Stuttgart), HARTTUNG (Breslau), HAVAS (Budapest), HELLER (Berlin), HERXHEIMER (Frankfurt a. M.), HOCHSINGER (Wien), JACOBI (Freiburg i. Br.), JANOVSKY (Prag), JESIONEK (Gießen), JOSEPH (Berlin), JULIUSBERG (Posen), KLINGMÜLLER (Kiel), KLOTZ (New-York), KOPP (München), KOPYTOWSKI (Warschau), KRZYSZTALOWICZ (Krakau), LANG (Wien), LEDERMANN (Berlin), LEWANDOWSKY (Hamburg), LINSER (Tübingen), LUKASIEWICZ (Lemberg), MAJOCCHI (Bologna), v. MARSCHALKO (Klausenburg), MATZENAUER (Graz), MAZZA (Modena), MEIROWSKY (Köln), MERK (Innsbruck), du MESNIL (Altona), NEUBERGER (Nürnberg), NOBL (Wien), OPPENHEIM (Wien), v. PETERSEN (Petersburg), PHILIPPSON (Palermo), PINKUS (Berlin), POSPELOW (Moskau), POSSELT (München), PROKSCH (Wien), REISS (Krakau), RIECKE (Leipzig), RILLE (Leipzig), ROSENTHAL (Berlin), SCHIFF (Wien), SCHOLTZ (Königsberg), SCHUMACHER II. (Aachen), SCHÜTZ (Frankfurt a. M.), SEIFERT (Würzburg), SPIETHOFF (Jena), STERN (Düsseldorf), TOMASCZEWSKI (Berlin), TOUTON (Wiesbaden), ULLMANN (Wien), VIGNOLO-LUTATI (Turin), VÖRNER (Leipzig), VOLLMER (Kreuznach), WAELSCH (Prag), v. WATRASZEWSKI (Warschau), WECHSELMANN (Berlin), WEIDENFELD (Wien), WELANDER (Stockholm), WINTERNITZ (Prag), WOLTERS (Rostock), v. ZEISSL (Wien), ZIELER (Würzburg), ZINSER (Köln), v. ZUMBUSCH (Wien)

und in Gemeinschaft mit

Doutrelepont, Finger, Jadassohn, Kreibich, Lesser, Riehl, Veiel, Wolff,
Bonn Wien Bern Prag Berlin Wien Cannstatt Straßburg

herausgegeben von

A. Neisser, Breslau und W. Pick, Wien.

Das **„Archiv für Dermatologie und Syphilis“** erscheint als **Originalteil** in zwanglosen Heften. 72 Bogen bilden einen Band. Kostspielige Tafeln werden einem Bogen gleich berechnet. Preis Mk. 36.— = K 43.20. Der **Referatenteil** erscheint allmonatlich in Heften von 7—8 Druckbogen. Auch hier bilden 72 Bogen einen Band zum Preise von Mk. 36.— = K 43.20.

Aus der Universitätspoliklinik für Hautkrankheiten zu Halle a. S.
(Direktor: Prof. Dr. C. Grouven.)

Die Kultur der Spirochaete pallida und ihre experimentelle Verwertung.

ACAD. LUGD. BAT. BIBL.

Von

Dr. **H. Sowade**,
Assistent der Königl. Universitätspoliklinik für Hautkrankheiten zu Halle a. S.

(Hiezu Taf. VI u. VII.)

Schon bald nach Entdeckung der Syphilisspirochaete durch Fritz Schaudinn im März 1905 begannen von verschiedenster Seite Versuche, den Erreger außerhalb des Organismus künstlich zu züchten. Als erstem gelang es Levaditi, in Kollodiumsäckchen, die mit auf 60° erhitztem Menschenserum erfüllt, mit spirochaetenhaltigem Material beimpft und alsdann in die Peritonealhöhle von Affen gebracht waren, eine Vermehrung von Spirochaeten des Pallida-Typs neben bakteriellen Verunreinigungen nachzuweisen. Auch Schereschewsky hatte bei der Nachprüfung dieser Methode Erfolge, desgleichen bei Verwendung von Schilfsäckchen an Stelle von Kollodiumsäckchen. Die Züchtung des Erregers in vitro schien jedoch eine Zeitlang unmöglich, bis es schließlich Schereschewsky gelang, eine erste Kulturgeneration der Pallida auf Aszites zu gewinnen. Zuverlässigere Resultate erhielt er mit erstarrtem Pferdeserum, wobei eine Weiterimpfung der gewachsenen Spirochaeten von Röhrchen zu Röhrchen gelang. Mühlens, Arnheim, Levaditi und Stanesko u. a. konnten Schereschewskys Beobachtungen bestätigen. Seine experimentellen Ergebnisse schilderte Schereschewsky wie folgt:

„Die Züchtung der Spirochaeta pallida gelingt bei 37° in 3 bis 5 Tagen auf Pferdeserum, welches bei 60° bis zur gallertartigen Konsistenz gebracht wird und durch etwa dreitägiges Stehen im Thermostaten bei 37° einer teilweisen Autolyse unterworfen wird. Das Anlegen der Ausgangskultur geschieht am besten durch Versenken eines syphilitischen Papel- oder Kondylomfragments in ein mit Kork verschlossenes Zentrifugenglas, welches bis zu $^2/_3$ mit dem besagten Medium aufgefüllt wird."

Von dieser Methode sind im wesentlichen bis zum heutigen Tage alle Experimentatoren, die sich mit der Spirochaetenzüchtung befaßt haben, ausgegangen. Das Ergebnis dieser Methode ist aber zunächst nur die Gewinnung einer Mischkultur, d. h. die Gewinnung von Spirochaetenwachstum in Begleitung von Keimen verschiedenster und wechselnder Art je nach dem Gehalt an Verunreinigungen im Ausgangsmaterial. Das Endziel muß natürlich die Reinkultur der Pallida sein. Eine Reinzüchtung des Syphiliserregers ist bisher nur Mühlens, Noguchi, Marinestabsarzt Hoffmann und mir selbst gelungen. Mühlens und Hoffmann arbeiteten nach der gleichen Methode. Noguchis Verfahren weicht wesentlich davon ab und auch meine eigene Methode unterscheidet sich wiederum erheblich von denen der anderen Autoren. Schon aus dieser Tatsache geht hervor, daß es verschiedene Möglichkeiten gibt, die Pallida rein zu züchten. Das Verfahren ist jedoch nach jeder Methode schwierig, erfordert Übung und Geduld, reichliche Enttäuschungen bleiben nicht aus.

Meine ersten Versuche begann ich vor etwa $2^1/_2$ Jahren in der damals Herrn Geheimrat Doutrelepont unterstellten Universitäts-Hautklinik in Bonn a. Rh. Der Hilfe und Anregungen meines hochverehrten Lehrers bei Beginn meiner Arbeit gedenke ich mit aufrichtiger Dankbarkeit.

A. Mischkulturen.

Zunächst kam es mir darauf an, die Angaben Schereschewskys über die Züchtungsmöglichkeit der Pallida in Pferdeserum nachzuprüfen.

Den Pferdeserum-Nährboden stellte ich mir in der Weise her, daß ich Pferdeblut beim Schlachten in sterilen hohen Meßzylindern auffangen ließ. In diesen Gefäßen blieb das Blut im Eisschrank stehen, bis sich der Blutkuchen absetzte und das obenstehende Serum in sterile Reagenzröhrchen bis ca. 8 *cm* Höhe abpipettiert werden konnte. An drei auf einander folgenden Tagen wurden die Nährröhrchen dem Wasserbade von 58° auf je 2 Stunden übergeben, am letzten Tage wurde die Temperatur des Wasserbades schließlich so weit erhöht, daß das Serum zur gallertigen Konsistenz erstarrte. Der Nährboden war während der fraktionierten Sterilisierung stets honiggelb und gut durchsichtig, bei Erhöhung der Temperatur über 58° trübte er sich jedoch regelmäßig; die Trübung war, wenn die gewünschte Festigkeit des Nährmediums erreicht war, nicht selten sogar so intensiv, daß jede Beobachtung der Wachstumsvorgänge unmöglich war. Der Entwicklung der Spirochaeten war jedoch nach meinen Erfahrungen auch ein intensiv trüber Nährboden nicht hinderlich. Nach Schereschewskys Vorschrift muß der bereitete Nährboden noch 3 Tage lang bei 37° einer „teilweisen Autolyse" unterworfen werden. Diese Vorschrift habe ich nie befolgt und habe trotzdem ausgezeichnete Wachstumsresultate erzielt.

Auf die geschilderte Weise einen sterilen Nährboden zu erhalten, ist fast unmöglich, wie ich mich oft überzeugen konnte. Die Nährbodenbereitung werde ich weiter unten noch eingehend besprechen müssen, ich möchte aber schon an dieser Stelle darauf hinweisen, daß das sterile Auffangen von Pferdeblut bei einer Schlachtung von vornherein unwahrscheinlich ist. Eine aseptisch ausgeführte Venenpunktion würde vielleicht die Möglichkeit bieten, doch dürfte dazu kaum eine regelmäßige Gelegenheit geboten werden.

Ausgangsmaterial: Im Laufe meiner Versuche habe ich die verschiedensten syphilitischen Produkte zu Kultivierungszwecken benutzt. Soweit ich Versuche lediglich zum Zwecke der Züchtung der Pallida gemacht habe und nicht zu diagnostischen Zwecken, bediente ich mich sicher spirochaetenhaltigen luetischen Substrats vom Menschen. Wenn möglich, prüfte ich das Ausgangsmaterial vorher auf Anwesenheit der Pallida, was

jedoch bei sicher luetischen und erfahrungsgemäß immer spirochaetenhaltigen Veränderungen wirklich überflüssig ist. Denn selbst wenn der Spirochaetennachweis im Dunkelfeld oder im gefärbten Ausstrich nicht gelang, namentlich bei voraufgegangener örtlicher Behandlung mit Jodoform, Sublimat oder dergl., konnten positive Kulturresultate erzielt werden. Ich bevorzugte breite Kondylome und Primäraffekte, falls ihr Sitz die Abtragung in toto oder eines Stückchens möglich machte. Die Oberfläche der gewählten Veränderungen reinigte ich mechanisch mit Kochsalzberieselungen in kräftigem Strahl und durch Abreiben mit Kochsalztupfern. Alsdann wurde z. B. ein Kondylom mit einem Scherenschlag abgetragen, in linsen- oder halblinsengroße Stücke zerlegt; die Stückchen wurden zwischen den Branchen eines Péans zertrümmert, und der immer noch als ganzes zusammenhängende Detritus mittels steriler Sonde in die Tiefe eines Nährbodens an der Glaswand hinabgestoßen. Das beimpfte Röhrchen verschloß ich mit Wattestopfen und Gummikappe und hielt es im Brutschrank bei 37°.

In den nächsten Tagen entwickelt sich um das Impfmaterial schmutziggraues Wachstum; entlang den Weg, den das Impfmaterial beim Hinabstoßen in den Nährboden genommen hat, setzt sich dieses Wachstum fort, meist tritt schon sehr bald eine Verflüssigung des Nährbodens im Impfkanal ein, die nicht selten nach 8 bis 10 Tagen zu einer Verflüssigung des gesamten starren Mediums bis auf einen mehr oder weniger großen festen Kern führt. Dem geöffneten Kulturröhrchen entströmt ein schwefelwasserstoffähnlicher widerlich fauliger Geruch. Untersucht man zu dieser Zeit einen Tropfen verflüssigten Nährbodens im Dunkelfeld, so findet man in der Regel zahlreiche Spirochaeten neben bakteriellen Beimengungen verschiedener Art.

In jedem Falle wird nun zunächst die Frage zu entscheiden sein: Sind die gewachsenen Spirochaeten wirklich pallidae? In erster Linie kommen als Kriterien die morphologischen Eigentümlichkeiten in Betracht. Die Entscheidung ist für den geübten Untersucher meist nicht so schwierig. Im Dunkelfeld ist die zarte, wenig lichtbrechende, mit regelmäßigen, steilen Windungen versehene Pallida, die in sich wellenförmige, außerdem peitschende

oder wie in Gelenken knickende Bewegungen macht, so wohl zu unterscheiden von der flach gewundenen dickeren Spirochaete refringens, daß nur selten Zweifel aufkommen, ob dieser oder jener Typ vorliegt.

Schereschewsky berichtet auf Grund seiner ersten Beobachtungen, daß bei Kultivierung von Spirochaeten aus menschlichem Luesmaterial in den ersten Generationen der Typus des Refringens prävaliert, um in weiteren Passagen nahezu gänzlich zu verschwinden und dem Typ der Pallida Platz zu machen. Auch Mühlens berichtet, daß er in der überwiegenden Zahl seiner Züchtungsversuche nach Schereschewskys Methode Spirochaeten vom Refringenstyp erhielt, und daß in den Fällen, in denen anfangs Pallida und Refringens neben einander wuchsen, meist die Refringens schließlich allein das Feld behauptete. Auch ich habe Kulturen gezüchtet, die von vornherein Spirochaeten zeigten, die der Refringens glichen und diese Formen auch bei der Weiterimpfung behielten; andererseits habe ich von der Ausgangskultur an — und zwar meist — nur Generationen vom Pallidatyp gewonnen. Übergänge von der einen in die andere Form scheinen mir ausgeschlossen, wahrscheinlich ist, woran auch Schereschewsky und Mühlens denken, daß bei solchen Beobachtungen die Refringens in weiteren Passagen zu Grunde geht und der ursprünglich spärlichen, jetzt mehr wachsenden Pallida das Feld räumt und umgekehrt.

Die Weiterimpfung einer Pallida-Mischkultur von Röhrchen zu Röhrchen, also das Anlegen weiterer Generationen, führte ich mit einer Rekordspritze mit 20 *cm* langer Kanüle aus. Aus beliebiger Stelle des Nährbodens entnahm ich mit der Spritze das Impfmaterial, führte die Kanüle auf den Grund eines frischen Nährröhrchens und beschickte es mit einem Tropfen des Spritzeninhalts. Man sieht auch im getrübten Serum den Stichkanal und beobachtet im Laufe der nächsten Tage ein schmutziggraues Wachstum in seinem Verlauf, das allmählich zunimmt, den Nährboden in der Regel verflüssigt und wiederum meist in 8 bis 10 Tagen bei Untersuchungen im Dunkelfeld massenhafte Spirochaeten zeigt.

Auf diese Weise können, wie schon Schereschewsky angab, beliebige Generationen gewonnen werden.

Mühlens berichtet, daß ihm nach der Schereschewskyschen Methode die Spirochaetenkultur „lange nicht in allen Fällen, selbst wenn im Ausgangsmaterial reichlich Spirochaeten vorhanden waren", gelang. Von 76 verschiedenen Kulturversuchen mit menschlichem Material erhielt er nur 14 mal sichere kulturelle Spirochaetenvermehrung in vitro, und die gewonnenen Spirochaeten zeigten meistens den Refringenstyp.

Demgegenüber gelang mir die Mischkultur fast in der Regel. Die spärlichen Versager bei meinen Versuchen kommen zahlenmäßig kaum in Betracht. Diese Regelmäßigkeit im Erfolge hat mich dann auch veranlaßt, das Kulturverfahren direkt zum Spirochaetennachweis heranzuziehen und, wie ich weiter unten auseinandersetzen werde, mit sehr befriedigendem Ergebnis.

Am zweckmäßigsten geschieht die Fortzüchtung einer Spirochaeten-Mischkultur am 8. bis 10. bis 15. Tage. Zu diesen Terminen ausgeführt, ist das Angehen der kommenden Generation wohl zu erwarten. Über diesen Zeitpunkt hinaus wird der Erfolg fraglich, und je älter die Kultur ist, um so unsicherer ist das Resultat.

Die regelmäßige Untersuchung spirochaetenreicher Mischkulturen über einen Monate langen Zeitraum ergab folgendes: Bis zur 3. oder auch 4. Woche findet man in den Kulturen meist morphologisch unveränderte Exemplare mit lebhafter Eigenbewegung. Die Bewegung läßt jedoch mit dem zunehmenden Alter der Kultur nach, wird allmählich träger, um schließlich ganz aufzuhören. Diese Beobachtungen bewegen sich natürlich, wie alle bei dem Studium der Lebensfähigkeit künstlich gezüchteter Mikroorganismen in weiten Grenzen. Die Bewegung der Spirochaeten hört bisweilen sehr schnell auf, manchmal hält sie sich über Monate. So habe ich in einer zweiten Kulturgeneration noch nach $4^1/_2$ Monaten außerordentlich mobile zahlreiche Pallidae gefunden und konnte diese Kultur zu dieser Zeit sogar noch erfolgreich auf ein Kaninchen überimpfen. Warum in dem einen Falle schnelles „Absterben" eintritt und in dem anderen eine lange Lebensdauer und lange Erhaltung

der „Virulenz“ zu beobachten ist, wird bei Kulturen, die unter gleichen Bedingungen angelegt und gehalten werden, oft überhaupt nicht zu ergründen sein. Das Wiederauftreten von Eigenbewegungen einmal bewegungslos gewordener Spirochaeten konnte ich bei meinen zahlreichen Beobachtungen niemals finden.

Das Aussehen unbeweglich gewordener, also wohl abgestorbener Spirochaeten ist häufig im Dunkelfeld, soweit das Kaliber und die Regelmäßigkeit der steilen Windungen in Frage kommen, unverändert. Nicht selten beobachtet man jedoch in „abgestorbenen“ Kulturen eine starke Quellung des Spirochaetenleibes und schließlich einen körnigen Zerfall.

Methoden der mikroskopischen Untersuchung der Kulturspirochaeten: Ein naturgetreues Bild eines Mikroorganismus kann nur die Betrachtung im lebenden Zustande geben. Schaudinn entdeckte bekanntlich die Spirochaete pallida im frischen Präparat. Sowohl die Untersuchung im hängenden Tropfen wie im frischen einfachen Deckglaspräparat bei gewöhnlicher Beleuchtung erfordert jedoch sehr große Übung und wird wohl kaum noch ausgeführt, seitdem man mittels der sogen. Dunkelfeldbeleuchtung eine vorzügliche und dabei einfach anzustellende Beobachtung des Lueserregers ermöglichen kann. Die Methode im Prinzip ist schon seit 1838 bekannt und von Rev. J. B. Reade als „Blackground Illumination“ bezeichnet worden. Eine Beschreibung der verschiedenen jetzt gebräuchlichen Dunkelfeldapparate würde über den Rahmen dieser Arbeit hinausgehen. Im Dunkelfeld sieht der Untersucher die Spirochaete, wie sie tatsächlich ist, kann Form und Bewegungen eingehend studieren. Die Beschreibung der Kulturspirochaeten bei Dunkelfeldbeleuchtung erfolgt eingehender in dem Abschnitt: „Zur Morphologie der Kulturspirochaete“.

Ich sehe grundsätzlich jedes Präparat aus einer Kultur zunächst im Dunkelfeld an. Das Umranden des Deckgläschens von Dunkelfeldpräparaten mit Paraffin oder Wachs unterlasse ich, wenn es mir lediglich darauf ankommt, den Inhalt einer Kultur zu prüfen. Will ich die soeben im Dunkelfeld betrachteten Spirochaeten gefärbt nachuntersuchen, so ziehe ich das Deckglas vom Objektträger ab und lasse die gewünschte Färbung folgen. Es ist nach meinen Erfahrungen gleichgültig, ob

Ausstrichpräparate in Alkohol, über 1%iger Osmiumsäure, über Formalin, schnell in der Flamme oder durch langes Trocknen an der Luft fixiert werden. Die Schnellfärbung nach Fornet-Schereschewsky wende ich an, wenn mir an einem schnell herzustellenden gefärbten Präparat gelegen ist; auch das Burrische Tuscheverfahren erfüllt diesen Zweck. Zur tinktoriellen Spirochaetendarstellung bediene ich mich im übrigen ausschließlich der Giemsafärbung (auf 1 *ccm* Aqu. dest. 1 Tropfen Giemsalösung). Bei frischen Ausstrichen aus menschlichem Material erzielt man mit dieser Färbemethode in 24 Stunden stets ein gutes Resultat. Öfter machte ich jedoch die Beobachtung, daß bei nachträglicher Färbung von Kulturspirochaeten, die ich im Dunkelfeld in großer Zahl gefunden hatte, das Resultat schlecht oder sogar völlig negativ war. In manchen Fällen gelang mir der Nachweis der gefärbten Lueserreger erst nach 3 bis 6 Tagen bei täglicher Erneuerung der Farblösung. Ich habe hierfür keine Erklärung finden können, glaubte anfangs, daß die schlechte Färbbarkeit eine Eigentümlichkeit der Kulturspirochaeten ist, mußte diese Vermutung jedoch wieder fallen lassen, als ich später bei meinen Reinkulturen immer das Optimum der Färbung nach spätestens 24 Stunden, und gut brauchbare Bilder schon nach wenigen Stunden fand. Mühlens schreibt sogar: „Die Kulturspirochaeten färben sich also besser und leichter nach Giemsa als die Pallida aus frischem luetischen Material."

Außer der von Schaudinn und Hoffmann ursprünglich benutzten und auch jetzt noch am besten bewährten „Giemsaschen Originalfärbung" sind von verschiedenen Autoren andere Färbemethoden als brauchbar zur Spirochaetendarstellung angegeben worden. Die besten Resultate liefern nach meinen Erfahrungen nächst der Giemsafärbung die Färbung mit Anilinwasser-Gentianaviolett oder mit Karbol-Gentianaviolett sowie vor allem die Färbung mit Karbolfuchsin. Um leidliche Bilder zu erhalten, muß man die Farblösungen jedoch ebenfalls wenigstens 24 Stunden einwirken lassen.

Die Mischkultur zu diagnostischen Zwecken. Bei der Gewinnung von Pallida-Mischkulturen galt für alle Untersucher der erfolgreiche Nachweis der Pallida im Ausgangs-

material als Vorbedingung. Ich habe schon darauf hingewiesen, daß ich bei meinen Züchtungsversuchen aus erfahrungsgemäß spirochaetenhaltigen Veränderungen mit einer gewissen Regelmäßigkeit Spirochaetenwachstum in Pferdeserum erhalten habe. Diese Regelmäßigkeit des Erfolges führte mich dazu, zu prüfen, ob auch aus solchen luetischen Prozessen die Pallidazüchtung möglich ist, in denen der Spirochaetennachweis mit den üblichen Methoden gar nicht oder nur gelegentlich gelingt. In erster Linie kamen hier die tertiär luetischen Veränderungen in Frage. Über das Vorkommen von Spirochaeten in tertiären Formen existieren in der Literatur eine ganze Reihe von Mitteilungen, so von Schmorl, Kraus, Alvarez, Gondez, Malinowski, Tomasczewski, Doutrelepont und Grouven, Benda, Chirivino. Die Autoren fanden den Lueserreger entweder überhaupt nicht oder nach langen Bemühungen in ganz vereinzelten Exemplaren. Die alte Auffassung, daß tertiäre Produkte nicht infektiös sind, war schon vordem aufgegeben worden, als positive Verimpfungen tertiären Materials auf Versuchstiere bekannt wurden. (Neisser, Finger-Landsteiner, E. Hoffmann, Buschke-Fischer, Tomasczewski u. a.) Betreffs der in der Literatur bekannt gegebenen Tierversuche stellt Neisser folgendes Resümee auf: „Die frische bzw. noch nicht durch Nekrose und Vereiterung zerstörte syphilitische Neubildung (also unversehrte Gummata, die Randpartien serpiginöser Formen) enthält, auch wenn sie als sogen. tertiäre Form auftritt, Parasiten, die, auf Affen überimpft, typische Primäraffekte erzeugt."

Daß nicht mit jedem Stückchen tertiären Materials ein positiver Impferfolg erzielt werden kann, ist ohne weiteres verständlich, da bei der Spärlichkeit des vorhandenen Virus nicht jedes Gewebspartikelchen virulente Keime beherbergen wird. Enthalten also Veränderungen der Spätlues überhaupt entwicklungsfähige Spirochaeten, so müssen aus solchen Veränderungen auch Kulturen gezüchtet werden können.

Die Protokolle dahingehender Versuche führe ich hier auf:

1. Frau Auguste D., 47 Jahre alt, Witwe. War früher nie ernstlich krank. Hat 1889 geheiratet, 3 Fehlgeburten durchgemacht, kein ausgetragenes Kind geboren. Von einer Infektion weiß sie nichts. Im Sommer 1907 entwickelten sich geschwürige Prozesse, zunächst auf dem Rücken,

dann am linken Arm, später am rechten Arm und vor 2 Jahren am rechten Knie und rechten Unterschenkel, die z. T. spontan unter Narbenbildung, z. T. bei ärztlicher Behandlung mit Jod heilten. Am 20. Juni 1911 Aufnahme auf die Hautabteilung der Königl. medizinischen Klinik in Halle a. S. (leitender Arzt Prof. Dr. Grouven). Auf dem Rücken der Patientin fanden sich ausgedehnte Narben, deren Aussehen auf abgelaufene ulzeroserpiginöse Veränderungen ohne weiteres schließen ließ, neben frischen, bis handtellergroßen, z. T. mit Krusten bedeckten ulzerierten Herden. Gleiche Veränderungen zeigten beide Vorderarme einschließlich Ellenbogengelenke sowie das rechte Knie und der rechte Unterschenkel. Die Wassermannsche Reaktion: ++++. Am 2. Juli 1911 wurde von dem Rande eines Herdes am rechten Unterschenkel ein Stück exzidiert, wobei ein schmaler Streifen der Granulationsfläche mitentfernt wurde. Linsengroße Stückchen des gewonnenen Materials wurden in der üblichen Weise in erstarrtes Pferdeserum versenkt (4 Röhrchen). Am 11. Juli, also am 9. Tage, zeigte der größtenteils verflüssigte, stark faulig riechende Nährboden sämtlicher 4 Röhrchen in allen seinen Schichten zahllose, schönste, lebhaft bewegliche Pallidae in Mischkultur. Am 14. Juli 1911 wurden dem Kaninchen 82 $1^1/_2$ *ccm* dieser spirochaetenreichen Mischkultur in das Parenchym des rechten Hodens injiziert. 7 Wochen später wurde in beiden Hoden eine Orchitis circumscripta festgestellt, die Wassermannsche Reaktion (nach Blumenthal) war positiv.

2. Witwe Minna P., 65 Jahre alt, kam am 28. Juni 1911 in poliklinische Behandlung. Sie hatte 13 Schwangerschaften durchgemacht, von denen 3 mit einer Fehlgeburt endigten. Anamnese bezüglich Lues negativ. Seit $^1/_4$ Jahr charakteristische gummöse Prozesse der Haut am rechten Knie. Exzision eines noch unversehrten Gummiknotens, Versenkung linsengroßer Stücke in erstarrtes Pferdeserum (4 Röhrchen), Blutentnahme zur Wassermannschen Reaktion verweigert. Nach 10 Tagen in sämtlichen Kulturen, die bezüglich Geruch und Aussehen die bekannten Merkmale aufweisen, spärliche (d. h. 1 bis 2 im Gesichtsfeld), aber typische, gut bewegliche Spirochaetae pallidae. Die gummösen Prozesse heilten langsam unter energischer Jodbehandlung, andere Behandlung wurde verweigert.

3. Aufseher Karl K., 66 Jahre alt, kam am 3. Oktober 1911 in poliklinische Behandlung. Infektion im Feldzuge 1866; damals Schmierkur, sonst unbehandelt. Seit 1 Jahr bestehen ulzero-serpiginöse Infiltrate, die fast den ganzen rechten Ober- und Unterarm einnehmen und teilweise unter Narbenbildung spontan geheilt sind. Wassermannsche Reaktion stark positiv (++++). Ausgangsmaterial zur Kultur: Randinfiltrat mit Granulationssaum vom rechten Unterarm (3 Röhrchen beimpft). Am 13. Tage zeigte 1 Röhrchen das Aussehen einer charakteristischen Mischkultur; im Dunkelfeldpräparat wurden typische, gut bewegliche Pallidae gefunden. $3^1/_2$ Monate später waren in derselben Kultur noch morphologisch unveränderte, allerdings unbewegliche Spirochaeten vorhanden.

4. Emma R., 25 Jahre alt, Bergmannsfrau. Seit 6 Jahren verheiratet, früher nie ernstlich krank. War 4 mal schwanger; 3 Kinder ausgetragen, von denen eins lebt ($1^1/_2$ Jahre alt) und gesund sein soll. Die beiden anderen starben in den ersten Lebensmonaten an unbekannter Krankheit. 1 Frühgeburt — Tod nach 8 Stunden. Bei der Aufnahme in die Klinik am 5. Dezember 1911 Gravida V. mens. Seit 1 Jahr geschwüriger Ausschlag im Gesicht, der von der Nase ausging, auf die rechte Wange übergriff und sich schließlich bis hinter das rechte Ohr ausdehnte. Gleichzeitig entstanden ähnliche Veränderungen am rechten Vorderarm und auf der Brust. Charakteristische ulzero-serpiginöse Syphilide. Bei der Aufnahme fand sich außerdem ein taubeneigroßes Gumma mitten auf der Stirn. Die Veränderungen wurden bisher für lupös gehalten und anderweitig entsprechend behandelt. Wassermannsche Reaktion stark positiv (++++). Am 11. Dezember 1911 Anlegen von 5 Kulturröhrchen, Ausgangsmaterial: Randinfiltrat eines ulzero-serpiginösen Herdes am rechten Vorderarm. 28. Dezember 1911: In 4 Röhrchen Verflüssigung und charakteristischer Foetor. In jedem Gesichtsfeld von Dunkelfeldpräparaten 2 bis 3 typische Spirochaetae pallidae.

5. Minna E., 22 Jahre alt, Dienstmädchen. Anamnese bezüglich Lues negativ; vor 3 Jahren Geburt eines ausgetragenen, noch lebenden, angeblich gesunden Mädchens. Seit $1^1/_2$ Jahren ausgedehnter geschwüriger Zerfall der rechten großen Schamlippe. Kam am 13. November 1911 in poliklinische Beobachtung (überwiesen von der Königl. Frauenklinik auf Veranlassung des Herrn Geh.-Rat Veit). Das rechte labium maius ist erheblich verdickt; die obere Hälfte ist von einer serpiginös begrenzten Narbe eingenommen, die untere Hälfte ist ulzerös zerfallen und mit papillären Wucherungen bedeckt. In der rechten Leiste eine vergrößerte, nicht druckempfindliche Drüse. Spirochaetennachweis gelingt weder im Giemsa gefärbten Ausstrich, noch im Dunkelfeld. Wassermannsche Reaktion stark positiv (++++). Stückchen vom Randinfiltrat in 4 Röhrchen mit erstarrtem Pferdeserum versenkt. Am 25. November 1911 charakteristisches Wachstum unter Verflüssigung des Nährmediums, charakteristischer Geruch. 27. November 1911 weit vorgeschrittene Verflüssigung. in sämtlichen Röhrchen Fötor, grauweißes dichtes Wachstum am Boden. Im Dunkelfeld zahllose herrlichste, sehr mobile absolut typische Pallidae. Mit der zweiten Generation dieses Stammes wurden spirochaetenhaltige Veränderungen bei Kaninchen 81 (s. S. 290) durch intraarterielle Impfung hervorgerufen.

Bei allen diesen 5 Fällen gelang also der kulturelle Spirochaetennachweis aus tertiären Produkten. Bei 3 Fällen war das Spirochaetenwachstum nicht übermäßig üppig, bei 2 Fällen aber ganz außerordentlich reichlich. Die Kulturen von Fall 1 und 5 gingen in der dritten Generation zu Grunde. Allerdings konnte ich bei den Weiterimpfungen aus äußeren Grün-

den nicht die erfahrungsgemäß günstigen Termine innehalten. Bei den übrigen Fällen beschränkte ich mich von vornherein auf den positiven Kulturerfolg der ersten Generation.

Den 5 gelungenen Züchtungsversuchen aus tertiären Produkten stehen 2 vollkommene Mißerfolge gegenüber. In dem einen Fall handelt es sich um eine Patientin, die nach 4 Salvarsaninjektionen und einer Schmierkur von 200 *g* ungt. ciner. noch ein kleinhandtellergroßes Ulkus an beiden Unterschenkeln hatte bei stark positiver Wassermannscher Reaktion, und in dem anderen Falle um ein frisches, noch nicht zerfallenes Gumma der rechten äußeren Nasenhälfte, ebenfalls bei positiver Seroreaktion.

Besonders bemerkenswert scheint mir der positive Impferfolg bei Fall 3, bei dem 45 Jahre nach der Infektion aus einer spezifischen Veränderung noch Spirochaeten gezüchtet werden konnten. Meines Erachtens kommt in praktischer Bedeutung die Möglichkeit, die Pallida aus Erscheinungsformen der Spätlues zu züchten, bei der Beurteilung der Frage der Infektiosität tertiärer Syphilide der erfolgreichen Übertragung solcher Veränderungen auf Tiere sehr nahe. In diesem Sinne wird E. Hoffmanns Impferfolg beim Tier mit dem Produkt einer 24 Jahre bestehenden Lues von dem zitierten Fall weit übertroffen.

Auch der Nachweis der Spiroch. pallida im Luetikerblut, in dem er bekanntlich mittels der üblichen Darstellungsmethoden bisher nur sehr selten und mit großer Mühe möglich war, ist durch die Kultur (Prof. Grouven) mehrfach gelungen.

Es lag nahe, mittels des Kulturverfahrens auch den Einfluß der jetzt üblichen Allgemeinbehandlung der Lues mit Salvarsan und Quecksilber auf die Züchtungsmöglichkeit des Luceserregers aus syphilitischen Manifestationen zu prüfen. Bei diesen Versuchen konnte ich keine grundsätzliche Trennung in solche Fälle, die nur mit Hg, nur mit Salvarsan oder kombiniert behandelt wurden, vornehmen, da wir selbst schon seit langem ausschließlich die kombinierte Behandlung durchführen. Ich mußte also die Fälle nehmen, wie sie kamen, manchmal allein mit Hg vor- und dann von uns kombiniert weiterbehandelte.

manchmal allein mit Salvarsan vorbehandelte, aber auch frische, noch gar nicht therapeutisch beeinflußte.

Anfangs glaubte ich, schon am selben Tage einer intravenösen Salvarsaninjektion die Kulturen anlegen zu müssen, wenn ich bei der möglichen Therapia sterilisans magna nicht einen Mißerfolg erhalten sollte. Ich versenkte deshalb schon wenige Stunden nach der Injektion Stückchen von Kondylomen in Pferdeserum, dann am Tage nach der Injektion usw. Ich war überrascht, wie lange ich z. B. aus einem Kondylom bei energischer Hg- und Salvarsanbehandlung noch Kulturen gewinnen konnte. Als krassesten Fall will ich nur folgenden anführen:

Patientin K., 19 Jahre alt. Mit unbehandelter Lues II (Condylomata lata permulta ad anum et vulvam, Roseola, Angina, Plaques, Scleradenitis multiplex) am 14. September 1911 in die Klinik aufgenommen. Bis zum 17. Oktober 1911 hatte die Patientin 140 *g* ungt. ciner. geschmiert und drei intravenöse Salvarsaninjektionen (1 × 0·4 und 2 × 0·5) erhalten. An diesem Tage fand sich nur noch ein Kondylomrest in Gestalt eines hyperämischen Fleckes am rechten großen Labium. Exzision dieser Stelle, Versenkung von Stückchen in erstarrtes Pferdeserum. Das Ergebnis war ein massenhaftes Wachstum z. T. sehr mobiler Pallidae, die noch am 27. Januar 1912, also nach über 3 Monaten, in den Kulturen beweglich gefunden wurden.

Einen Kommentar brauche ich zu diesen Feststellungen nicht zu geben.

Luetische Produkte von Tieren habe ich als Ausgangsmaterial zu Züchtungsversuchen der Pallida nicht verwendet, dagegen habe ich zu diagnostischen Zwecken bei Tieren in folgenden beiden Fällen das Züchtungsverfahren nach Schereschewsky erfolgreich herangezogen.

1. Ein ausgewachsener männlicher Macacus rhesus wurde am 29. Juni 1911 mit 1 *ccm* einer 4. Generation der sehr spirochaetenreichen Mischkultur 122 in den rechten Hoden geimpft. Am 1. November 1911 wurden in beiden Leisten multiple stark geschwollene, offenbar indolente Lymphdrüsen festgestellt, ohne daß das Tier auf Haut und sichtbaren Schleimhäuten irgendwelche Veränderungen aufwies. Am 4. November 1911 wurden mehrere Lymphdrüsen aus der linken Leiste exstirpiert. Von 4 Dunkelfeldpräparaten vom Drüsenquetschsaft wurden nur in einem einzelne Pallidae gefunden, im Giemsa gefärbten Ausstrich des Quetschsafts gelang der Spirochaetennachweis leichter. Stückchen einer Drüse wurden sofort in üblicher Weise in Pferdeserum versenkt (4 Röhrchen). Am 28. November 1911 fanden sich in einem, wenig verflüssigten, aber

den charakteristischen Geruch verbreitenden Kulturröhrchen typische bewegliche Pallidae. Nähere Angaben über dieses Tier finden sich in dem Kapitel „Tierversuche".

2. Kaninchen 111 wurde am 24. Oktober 1911 mit 0·75 *ccm* einer im Verhältnis 1:3 mit steriler Kochsalzlösung verdünnten Spirochaetenmischkultur in die rechte Carotis communis geimpft. Bis zum 10. November 1911 keine Erscheinungen. An diesem Tage aber Wassermannsche Reaktion nach Blumenthal positiv (++). Am 5. Dezember 1911 bestand ein linsengroßes Ulkus der rechten Skrotalhälfte, das mit dem darunterliegenden Hoden fest verlötet war. Der rechte Hoden selbst war stark verdickt. Spirochaetennachweis gelang weder im Dunkelfeld noch im Giemsapräparat. 6. Januar 1912 rechter Hoden operativ entfernt! Typische Periorchitis diffusa syphilitica (nach Uhlenhuth und Mulzer). Stückchen der stark verdickten schwieligen Hodenhöhlen wurden in 10 Röhrchen erstarrtes Pferdeserum versenkt. In sämtlichen 10 Röhrchen nach 12 Tagen charakteristische Verflüssigung unter Verbreitung des schwefelwasserstoffähnlichen Geruchs. In Dunkelfeldpräparaten: Spirochaetae pallidae in reichlicher Menge.

Diesen beiden erfolgreichen Züchtungen des Erregers aus klinisch luetischen Veränderungen beim Tier stehen allerdings eine große Zahl negativer Resultate gegenüber.

B. Reinkulturen.

Die von verschiedenster Seite angestellten Versuche, eine Reinkultur der Spirochaete pallida zu gewinnen, haben bis zum heutigen Tage nur vereinzelte Erfolge gehabt. Das vorgeschriebene Endziel muß ein Verfahren sein, bei dem aus jedem spirochaetenhaltigen Material eine Reinkultur zu erhalten ist. Ein elektiver Nährboden, d. h. ein Nährboden, auf dem allein die Spirochaete pallida fortkommt, würde dieses Ziel am sichersten erreichen. Solange dieser Nährboden nicht gefunden ist, wird man auf Methoden sinnen müssen, welche die Pallida von den Begleitbakterien einer Mischkultur zu trennen vermögen. Eine mechanische Trennung hat Noguchi einige Male erfolgreich mit Hilfe von Berkefeldfiltern vorgenommen. Es bleibt auch die Aussicht, nicht verunreinigtes spirochaetenhaltiges Ausgangsmaterial zur Reinzüchtung zu benutzen, oder aber das Ausgangsmaterial vor der Impfung so zu präparieren, daß jede Sekundärinfektion ausgeschaltet wird. Meine eigenen, sich in

diesen beiden Richtungen bewegenden Versuche sind sämtlich erfolglos geblieben. Wir wissen, daß die Leber luetischer Föten unter Umständen kolossale Spirochaetenmengen beherbergt. Ich habe solche Föten wiederholt unmittelbar nach der Geburt durch die Liebenswürdigkeit des Herrn Geheimrat Veit in Halle a. S. erhalten, habe unter allen Kautelen die Leber entnommen und mir schließlich aseptisch aus der Mitte des Organs Impfmaterial geholt. Ich habe auf diese Weise nicht einmal Spirochaetenwachstum in Mischkultur, viel weniger Reinkulturen erhalten.

Haften die Keime, welche zur Mischkultur Veranlassung geben, nur auf der Oberfläche oder in den oberflächlichsten Schichten des Ausgangsmaterials, so mußte ein Verfahren Aussicht bieten, reines Ausgangsmaterial zu erhalten, bei dem es gelang, diese Verunreinigungen vor der Impfung abzutöten, ohne jedoch die das ganze Gewebsstück durchsetzenden Spirochaeten zu schädigen. Auch dahingehende Versuche schlugen fehl. Ich ließ z. B. Kondylome durch Sublimatverbände vor der Abtragung wenigstens 24 Stunden lang präparieren oder nahm eine Desinfektion des Operationsfeldes mit Jodtinktur vor. Das abgetragene Impfstück tauchte ich einige Sekunden in siedendes Öl, darauf schnell in kaltes, sicher steriles destilliertes Wasser und versenkte es dann in erstarrtes Pferdeserum. Das Resultat waren Mischkulturen; desgleichen, wenn ich große Gewebsstücke vorher in der Flamme äußerlich verkohlte und alsbald zerquetscht verimpfte.

Alle Autoren, welche die Syphilisspirochaete isolieren konnten, gingen von Mischkulturen aus. Die verschiedenen Methoden, welche zum Erfolg geführt haben, sind folgende:

1. Reinzüchtung durch P. Mühlens und W. H. Hoffmann. Mühlens, dem bekanntlich schon 1906 die Isolierung der Spirochaete dentium als erste Spirochaetenreinkultur gelungen war, versenkte zerquetschte Stückchen der exstirpierten Leistendrüse eines Patienten mit Lues II, in deren Punktionssaft mäßig zahlreiche typische Pallidae vorher gefunden waren, in halbstarres Pferdeserum und erhielt sehr spirochaetenreiche, verhältnismäßig wenig verunreinigte Mischkulturen. Von der 2. und 3. Generation dieser Mischkulturen machte er Isolierungsversuche in demselben Nährboden, in dem er die Spirochaete dentium rein gezüchtet hatte, und der in der Weise hergestellt wird, daß 2 Teile neutralen Agars und 1 Teil inaktiviertes klares steriles Pferdeserum bei 45° in Reagenz-

gläsern gemischt werden. In ein erstes Röhrchen brachte er 1 Öse des Spirochaetenmaterials, mischte gut und schüttelte dann dieselbe lange Impfnadel in 3 bis 5 weiteren Serumagarröhrchen aus, „um so hinreichende Verdünnungen und isolierte Kolonien zu erzielen". In 2 Röhrchen 3. Generation fand Mühlens 7 Tage nach der Impfung im unteren Drittel je eine feine wolkige Kolonie, die aus feinen Spirochaeten bestand, deren Weiterimpfung in Strichreinkultur zunächst nicht gelang. Bei einem anderen gleichartigen Isolierungsversuch erhielt Mühlens in einem Serumagarröhrchen 3 wolkige isolierte Spirochaetenkolonien, von denen aus die Stichreinkultur in der 5. Generation glückte und innerhalb 9 Monaten in Stichkulturen bis zur 32. Generation fortgezüchtet werden konnte.

Als Beweis für die „absolute Reinheit" führt Mühlens „wiederholte Prüfungen in Schüttelkulturen, sowie Überimpfungsversuche auf andere Nährböden" an.

Eine zweite sichere Reinzüchtung ist Mühlens selbst nicht gelungen. Bemerkenswert ist noch die Angabe, daß bei der Weiterimpfung der Reinkulturen mitunter von 30 bis 40 Röhrchen nur eins anging. Mühlens schließt daraus, daß noch nicht die günstigsten Existenzbedingungen für die Spirochaeten in seinen Kulturen vorhanden waren.

W. H. Hoffmann setzte die Versuche von Mühlens am königlichen Institut für Infektionskrankheiten in Berlin fort. Er konnte zunächst den ersten reinen Stamm innerhalb 2 Jahren 60mal von Röhrchen zu Röhrchen übertragen, also lebend und vermehrungsfähig erhalten.

Ein zweites Mal gelang es beiden Autoren zusammen, aus dem Hodenschanker eines Kaninchens einen Spirochaetenstamm zu züchten. Da jedoch die Möglichkeit besteht, daß beim Zusetzen eines bestimmten Begleitbakteriums Spirochaeten des ersten Stammes mit verimpft worden sind, so bezeichnen Mühlens und Hoffmann selbst diesen 2. Stamm nicht als einwandfrei.

Hoffmann allein gewann dann einen 3. Stamm aus dem Hodenschanker eines Kaninchens, den er auch weiterzüchten konnte, einen 4. Stamm aus einem menschlichen Schanker, von dem aber keine Weiterimpfung möglich war. Die Ursache für diesen Mißerfolg glaubt Hoffmann in zufälligen äußeren Umständen suchen zu müssen, da er nur 4 bis 6 Röhrchen zur Fortzüchtung beimpfte, während, wie bereits erwähnt, 20 bis 30 Röhrchen beimpft werden müssen, um Aussicht auf Wachstum wenigstens in einigen Röhrchen zu haben.

Bei den Isolierungsversuchen eines 5. Stammes ging Hoffmann schon nach einem bestimmten Plan vor. Von einer Mischkultur nach Schereschewsky in zehnter Generation machte er in den genannten Serumagarröhrchen je einen tiefen Stich; nach 8 Tagen zeigte sich in den meisten Röhrchen im Stich dickes undurchsichtiges Bakterienwachstum, um den Stich war eine 5 bis 8 *mm* zarte Trübung entstanden, die sich bei Dunkelfeldbeleuchtung als Spirochaetenwachstum erwies. Vom Rande solcher Trübungen impfte Hoffmann weiter mit dem Erfolg, daß eine allgemeine Trübung des Serumagars eintrat „infolge Durchwachsung des

ganzen Nährbodens mit Spirochaeten". Seinen Bericht über diesen Versuch schließt Hoffmann mit den Worten: „Im Nährboden selbst waren andere Keime kaum nachzuweisen, dennoch halte ich das Wachstum dieser Spirochaete noch nicht für rein."

Über einen 6. Isolierungsversuch aus einem menschlichen Schanker sagt schließlich Hoffmann: „Ich hoffe bestimmt, daß es möglich sein wird, auch diesen Spirochaetenstamm, den sechsten, auf dem künstlichen Nährboden (Serumagar) weiter zu züchten und ihn schließlich rein zu erhalten."

Sicher rein und einer Weiterimpfung zugängig waren von diesen Stämmen also zwei.

2. Reinzüchtung durch H. Noguchi. In Nr. 29 der Münchner medizinischen Wochenschrift 1911 erschien eine Mitteilung von Hydeyo Noguchi aus dem Laboratorium des Rockfeller Institute for Medical Research, New-York, betitelt: „Über die Gewinnung der Reinkulturen von pathogener Spirochaete pallida und von Spirochaete pertenuis." Ausführlichere Darstellungen über dieses Thema folgten im Journ. of exper. Med. Bd. 14. Nr. 2. 1911.

Noguchi benutzte als Ausgangsmaterial ausschließlich Passage-Kaninchen-Pallida und zwar 10 verschiedene Stämme, von denen einige bereits mehr als 12 Übertragungen von Tier zu Tier durchgemacht hatten. Noguchi berichtet wörtlich: „Zuerst habe ich vergeblich viel tausendmal versucht, die Pallida in verschiedenen Nährböden zu züchten. Die Kulturmedien, welche sich als völlig ungeeignet erwiesen, sind: reines Kaninchenblutplasma, flüssiges Blutplasma von Kaninchen und Pferden (durch Zusatz von Natr. oxalat.), dieselben nach Beseitigung des Oxalats mittels Kalziumchlorid, Plasmaagar, Plasmagelatine, Serumwasser, Serumagar, Serumgelatine, zuweilen mit Zusatz von gewissen Spaltungsprodukten der Eiweißkörper und zuletzt das erstarrte Pferdeserum". Der einzige Nährboden, welcher sich Noguchi als geeignet erwies, war ein Serumwasser (1 Teil Serum vom Schaf, Pferd oder Kaninchen und 3 Teile Wasser) mit Zusatz von ziemlich großen Stücken frischer Niere oder Hoden von normalen Kaninchen. Diesen Zusatz frischer Gewebsstücke zum Nährboden erklärt Noguchi für das Wesentliche und Unentbehrliche für die Spirochaetenzüchtung. Die Serumwassersäule im Kulturröhrchen muß ca. 15 *cm* hoch sein, sie wird nach der Impfung mit sterilem flüssigen Paraffinöl 3 *cm* hoch überschichtet. Vom Sauerstoff werden die Röhrchen durch Durchleiten von Wasserstoff (Kippscher Apparat) mittels steriler Kapillarpipette befreit, darauf kommen die Röhrchen in einen anaërobischen Apparat mit starker Pyrogallolsäurelösung. „Der ganze Apparat wird geschlossen und nach genügender Ansaugung (Vakuum) wird eine konzentrierte sauerstofffreie Kalilösung zugesetzt. Dies wird durch nochmaliges Durchleiten von Wasserstoff gefolgt und endlich wird der Apparat unter negativem Druck geschlossen und in den Brutschrank gesetzt." 2 Wochen lang darf die Kultivierung nicht unterbrochen werden.

Noguchi erzielte mit diesem komplizierten streng anaëroben Züchtungsverfahren in der Regel zunächst auch nur Mischkulturen, aus denen er dann die Pallida erst isolieren mußte. Diese Isolierung von anderen Keimen gelang durch „Anwendung zahlreicher Berkefeldfilter". Noguchi berichtet darüber: „Berkefeldfilter läßt die Pallida unter Luftdruck nicht passieren, aber wenn man die Pallida darin wachsen läßt, geht sie nach ungefähr 5 Tagen durch die Kerze, während die Bakterien zurückgehalten werden. Selbstverständlich ist nicht jede Kerze dazu geeignet." Eine zweite Isolierungsmethode Noguchis bestand darin, daß er die Spirochaeten, welche vom Stichkanal in die Umgebung wachsen und „zarte, weißliche durchsichtige Trübungen" bilden, von diesen Stellen reinen Wachstums aus trennte.

Mittels dieser Verfahren gewann Noguchi insgesamt 6 Pallidastämme. Er hebt zum Schluß seiner Ausführungen ausdrücklich hervor daß das erste Wachstum der Pallida auf künstlichem Nährboden recht schwer zu gewinnen ist, und daß seine 6 Stämme die Resultate „von unzähligen fruchtlosen Versuchsreihen" darstellen.

3. Eigene Isolierungsversuche und Gewinnung von Reinkulturen. Meinen erfolgreichen Darstellungen von Mischkulturen ließ ich natürlich sofort Versuche folgen, die Spirochaete pallida rein zu erhalten. Zunächst probierte ich in gemeinsamer Arbeit mit Prof. Dr. Selter in Bonn die von Mühlens angewandte Methode der Schüttelkultur. Ich hatte keine Erfolge, vermißte sogar in Pferdeserumagar jegliches Spirochaetenwachstum, so daß ich den Ausführungen Schereschewskys auf der Naturforscherversammlung in Königsberg 1910, daß Agar dem Fortkommen der Pallida sogar hinderlich zu sein scheine, in der Diskussion vollauf beipflichten mußte.

Bei weiteren Versuchen schüttelte ich z. B. eine Öse spirochaetenreicher Mischkultur in 20 *ccm* sterilisierte physiologische Kochsalzlösung von 37° aus, mischte gut und legte Serien von Stichimpfungen in reinem Pferdeserum an. Soweit überhaupt Spirochaetenwachstum gewonnen wurde, war es durch Begleitbakterien verunreinigt. Auch Isolierungsversuche in der Weise, daß die mit Material aus einer unverdünnten Mischkultur armierte Impfnadel der Reihe nach in 3 bis 6 Nährröhrchen gestoßen wurde, blieben resultatlos. Bei dieser Methode zeigte meist nur das erste Röhrchen Wachstum, während die übrigen steril blieben.

Von anderen Kulturmedien versuchte ich, wie schon oben erwähnt, ohne Erfolg Pferdeserumagar, welches ich mir nach

der Vorschrift von Mühlens bereitete. Ein Nährboden, der von vornherein als aussichtsvoll zur Spirochaetenzüchtung gelten mußte, ist Blutserum vom Menschen (Aszites, Hydrozelenflüssigkeit). Ich stellte mir z. B. aus dem Blut, das ich gelegentlich eines Aderlasses auffing, einen Nährboden in analoger Weise her wie den von mir benutzten Pferdeserumnährboden. Ich gewann auch spirochaetenhaltige Mischkulturen, konnte sie aber nicht weiter verimpfen. Wie eingangs erwähnt, gelang auch Schereschewsky Spirochaetenzüchtung auf Aszites, aber ebenfalls nur in 1. Generation.

Ich benutzte auch Rindergalle rein und gemischt mit Pferdeserum im Verhältnis 1 : 1, 1 : 2 und 2 : 1. In reiner Galle, in die das zertrümmerte Impfstück (Kondylomfragment, nässende Papel) versenkt war, fand ich während mehrwöchiger Beobachtung stets nur einzelne stark gequollene unbewegliche Spirochaeten, also wohl degenerierte Exemplare des Ausgangsmaterials. Dagegen konnte in dem Galle-Pferdeserumnährboden ein zweifelloses Spirochaetenwachstum wiederholt festgestellt werden; es fanden sich häufig reichlich, lebhaft bewegliche Spirochaeten vom Pallidatyp, die Verunreinigungen schienen oft recht unbedeutend. Indessen stand das Wachstum des Syphiliserregers in bezug auf Üppigkeit gegen das in reinem Pferdeserum erheblich zurück. Ich bin deshalb immer wieder zu diesem Nährboden zurückgekehrt.

Die Verflüssigung des Pferdeserums bei Mischkulturen in der geschilderten Weise kommt zweifellos auf das Konto von Begleitbakterien. Die von mir in Pferdeserum gewonnenen Reinkulturen zeigen jedenfalls keine derartige Verflüssigung, wenn auch bei älteren Kulturen (nach 5 bis 6 Wochen) bisweilen im festen Nährboden Risse auftraten, zwischen denen etwas Flüssigkeit zu finden ist.

In dem verflüssigten Material einer Mischkultur findet man bei der Dunkelfelduntersuchung Spirochaeten neben Kokken und Stäbchen verschiedenster Art. Finden sich im Präparat mikroskopisch noch feste, also nicht zur homogenen Flüssigkeit gewordene „Inseln“ des Nährbodens, so ist häufig auffallend, daß gerade diese mit Spirochaeten vollgepfropft sind. Ich entnahm deshalb von den Randpartien des Impfkanals mit der

Öse feste Nährbodenteile und fand in diesen, nachdem ich sie auf einem Objektträger unter einem Deckglas breit gequetscht hatte, meist zahllose Spirochaeten, nicht selten neben nur spärlichen Verunreinigungen. Es war also kein Zweifel, daß die Spirochaeten vom Orte der Aussaat in den festen Nährboden hineinwachsen. Der nächste Schritt war deshalb der, das Wachstum im Bereiche des Stichkanals bei Kulturpassagen, solange noch keine Verflüssigung des Nährbodens eingetreten ist, also noch keine Mischung aller gewachsenen Keime stattgefunden hat, genauer zu untersuchen. Schon bei Beginn meiner Versuche war mir ein mattes wolkiges Wachstum in der Umgebung des Stichkanals bei Passageimpfungen aufgefallen, das meist 3 bis 4 Tage nach der Impfung zu erkennen war und sich von dem dunklen Bakterienwachstum im Stich selbst abhob. Ich löste zum Zwecke der Untersuchung die feste Serumsäule durch Zertrümmern des Glases aus und zerschnitt sie mit sterilem Messer in Scheiben. Die zentralen Partien enthielten meist Spirochaeten neben zahllosen bakteriellen Verunreinigungen, die Randpartien enthielten dagegen vornehmlich Spirochaeten, aber nie völlig rein, sondern stets mit irgendeinem Keim gemischt. Auffallend häufig war das Begleitbakterium ein kurzes dickes, lebhaft bewegliches Stäbchen.

In meinen zahlreichen Protokollen habe ich über eine solcher Beobachtungen z. B. folgendes aufgezeichnet:

15. September 1911. Stamm 208. Ausgangsmaterial breites Kondylom, Versenkung von Stückchen in der üblichen Weise in Pferdeserum. 25. September 1911. Nährboden im Bereich des Impfkanals verflüssigt. Im festen Nährboden zur Seite des Impfkanals zahlreiche lebhafte Pallidae neben minimaler bakterieller Verunreinigung, dann und wann bewegen sich ein oder mehrere kurze, dicke, lebhaft wackelnde Stäbchen schnell durch das Gesichtsfeld. Anlegen der 2. Generation durch tiefen Stich der mit einem Partikelchen festen Nährbodens armierten Platinnadel. 19. Oktober 1911. Dunkelgraues Bakterienwachstum im Stichkanal, in der Umgebung desselben kleinwolkiges mattes Wachstum, das fast nur aus Spirochaeten besteht. Ich hoffte damals bestimmt, aus dieser Kultur schließlich reines Wachstum zu gewinnen; leider gehörten aber auch diese Bemühungen

zu meinen zahllosen Mißerfolgen, trotzdem ich neben reinem Pferdeserum auch wieder den Pferdeserum-Agarnährboden nach Angabe von Mühlens heranzog.

Auf Grund all dieser Beobachtungen wird man sich die Vorgänge in einer Schereschewskyschen Pferdeserumkultur wie folgt vorstellen müssen:

Das spirochaetenhaltige Impfmaterial, dem alle möglichen Bakterien beigemischt sein können, sei es auf der Oberfläche, sei es in den obersten Gewebsschichten, kommt in den Nährboden. Es findet ein Wachstum der ausgesäten Keime statt. Von den wachsenden Keimen bilden die Mehrzahl Kolonien am Orte der Aussaat, deren Wachstum per continuitatem fortschreitet. Die Spirochaete pallida verläßt vermöge ihrer bohrenden Eigenbewegung schon frühzeitig den Impfkanal und wächst, sich vermehrend, allmählich nach allen Richtungen in den festen Nährboden hinein. Dieses „Hineinwachsen in den Nährboden" ist schon wenige Tage nach der Impfung makroskopisch an einer matten wolkigen Trübung zu erkennen. Aber nicht allein Spirochaeten durchwandern den Nährboden, es gibt auch Stäbchen, die diese Eigenschaft besitzen und zu unliebsamen Begleitern der Pallida werden können. Kokken mit Eigenbewegung kommen dagegen kaum in Frage. Die für den Menschen pathogenen Kokken besitzen keine Bewegungsorgane, Kokken mit Bewegungsorganen werden wohl äußerst selten dem Ausgangsmaterial beigemischt sein. Infolge der meist frühzeitig unter dem Einfluß von Begleitbakterien einsetzenden Verflüssigung des Nährmediums, die oft rapid fortschreitet, kommt es zu einer Mischung aller gewachsenen Keime, die Auffindung von Stellen reinen Spirochaetenwachstums wird damit unmöglich.

Es mußte deshalb ein Verfahren gefunden werden, bei dem dieser fortschreitenden Verflüssigung Einhalt geboten wird. Das war aber nur möglich, wenn es gelang, das Bakterienwachstum im Bereiche des Impfkanals vollkommen zu vernichten, und zwar zu einer Zeit, wo die Spirochaeten schon weit in den festen Nährboden gedrungen sind und die Verflüssigung noch nicht zu weit gediehen ist.

Zunächst stellte ich Versuche über die Einwirkung verschiedener chemischer Mittel auf Pallidamischkulturen an. Ich benutzte Kulturen mit weit vorgeschrittener Verflüssigung, in denen die Spirochaeten sehr zahlreich und in lebhaftester Bewegung vorhanden waren. Die Beobachtungen wurden bei Dunkelfeldbeleuchtung angestellt. Bei den Versuchen wurde stets ein Kontrollpräparat der Mischkultur zum Vergleich angefertigt. Alsdann wurde 1 Öse Kultur auf den Objektträger gebracht und 1 Öse des zu prüfenden chemischen Mittels in gewünschter Konzentration zugefügt, mit der Öse gut gemischt, mit Deckglas bedeckt und mit Wachs umrandet. Für meine Ausführungen kommen an dieser Stelle nur 2 der von mir verwandten Chemikalien in Betracht: das Formalin und der Alkohol. Um Aussicht auf Erfolg zu haben, mußte ich nämlich für meine Zwecke ein Mittel finden, das imstande ist, noch ein gut Stück in den festen Nährboden einzudringen, um sicher alles per continuitatem fortgeschrittene Bakterienwachstum zu zerstören. Am geeignetsten erwies sich mir dazu der Alkohol in Verdünnung bis 70% abwärts; 50% Alkohol war in seiner Wirkung nicht ganz zuverlässig. Ich habe festgestellt, daß beim Zusetzen von 1 Tropfen 70% Alkohol zu 1 Tropfen Mischkultur bei Dunkelfeldbetrachtung fast sofort alle Keime abgetötet werden; in den Präparaten mit lebhaftester Beweglichkeit der Keime tritt annähernd im Augenblick des Zusetzens vollkommene Ruhe ein, auch die eben noch lebhafte Pallida wird vollkommen bewegungslos, ihr Leib quillt stark, sie erscheint körnig zerfallen. Diesen sehr interessanten Vorgang kann man sich unter eigenen Augen abspielen sehen, wenn man vom Rande eines nicht umwachsten Dunkelfeldpräparats einer Mischkultur 70% Alkohol zufließen läßt.

Es sei an dieser Stelle erwähnt, daß wir die fast momentane Wirkung des Alkohols auf die Pallida bei der örtlichen Behandlung von Primäraffekten verwertet haben, indem wir Ulcera dura, auf deren notwendige sorgfältigste örtliche Behandlung in letzter Zeit wiederholt aufmerksam gemacht worden ist, mit 70% Alkohol verbunden haben. Die Applikation ist zwar für einige Minuten schmerzhaft, der Erfolg dafür aber ausgezeichnet, weil der das „offene“ Gewebe durchdringende

Alkohol zu einer schnellen Heilung der Primärläsion ohne Hinterlassung einer Induration, vielleicht also auch ohne Hinterlassung virulenter Spirochaeten, führt.

Bei Verwendung des Alkohols zum Zwecke der Pallidareinzüchtung bin ich nun in der Weise vorgegangen, daß ich die Verflüssigung aus dem Impfkanal einer Mischkultur abgegossen habe und darauf 70% Alkohol zusetzte, den ich nach einigen Minuten erneuerte und im ganzen nicht länger als 10 Minuten einwirken ließ. In dieser Zeit gehen alle Keime im Bereiche des Impfkanals sicher zugrunde, fraglich ist nur, ob auch das Wachstum per continuitatem am Rande des noch festen Nährbodens sicher zerstört ist, d. h. ob der Alkohol weit genug in den Nährboden eingedrungen ist. In der Regel war auch dieser Zweck nach ca. 10 Minuten erreicht, wie ich mich in den kommenden Tagen überzeugen konnte. Die Einwirkung des Alkohols darf nicht zu lange ausgedehnt werden, vor allem darf nicht höher konzentrierter Alkohol in Anwendung kommen. 95%iger Alkohol entzieht dem Nährboden so schnell seinen notwendigen Wassergehalt, daß auch die schon weit vom Impfkanal entfernten Spirochaeten zugrunde gehen, wie ich wiederholt feststellen konnte.

Nach Entfernung des Alkohols wird sterilisiertes destilliertes Wasser aufgefüllt, das nach ca. 10 Minuten durch steriles Paraffinöl ersetzt wird. In den nächsten Tagen zeigt sich, ob das Verfahren den gewünschten Erfolg gehabt hat. Tritt keine erneute Verflüssigung und kein neues makroskopisch wahrnehmbares Bakterienwachstum ein, so ist die Abtötung der Keime im Gebiet des Impfkanals wahrscheinlich gelungen. In dem nun fest bleibenden Pferdeserumnährboden schreitet das Wachstum der Pallida ungestört fort, das makroskopisch als zunehmende milchig weiße Trübung des Mediums zu erkennen ist. Zerschneidet man etwa am 10. Tage eine so beschaffene Kultur, so findet man meist ohne Schwierigkeit Stellen reinen, sehr üppigen Spirochaetenwachstums. An bakteriellen Verunreinigungen kann man, wie schon angedeutet, nur solche Mikroorganismen erwarten, die vermöge ihrer Eigenbewegung den festen Nährboden durchwandern können. In diesem Falle ist die Möglichkeit, die Pallida zu isolieren, natürlich gering, da

sich bei der Weiterimpfung stets dasselbe Spiel wiederholen wird: die betreffenden Bakterien werden wieder mit den Spirochaeten den Nährboden von der Stelle der Aussaat durchwachsen und ihre unzertrennlichen Begleiter bleiben.

Nach diesem Verfahren habe ich in kurzer Zeit 3 Pallidastämme isolieren können. Ich beschreibe kurz die Methode, wie ich sie z. Z. übe:

Das spirochaetenhaltige Ausgangsmaterial wird zerquetscht mittels steriler Sonde an der Glaswand des Nährröhrchens, das bis zu ca. 12 *cm* Höhe mit erstarrtem Pferdeserum gefüllt ist, etwa 4 *cm* tief versenkt, so daß es sich an der Grenze zwischen oberem und mittlerem Drittel der Serumsäule befindet. Sobald im Impfkanal eine deutliche Verflüssigung konstatiert wird, was meist nach 4 oder 5 Tagen der Fall ist, wird diese Verflüssigung abgegossen und 70%iger Alkohol aufgefüllt, der ca. 10 Minuten einwirkt und während dieser Zeit einmal erneuert wird. Das Impfstück wird beim Abgießen manchmal mit aus der Kultur entfernt. Darauf wird der Alkohol durch sterilisiertes destilliertes Wasser ersetzt, an dessen Stelle wiederum nach ca. 10 Minuten steriles Paraffinöl tritt. Etwa am 10. bis 12., bis 15. Tage ritze ich die Kulturröhrchen dicht unterhalb der Stelle, wo das Ausgangsmaterial lag, mit einer Feile an, reibe das Glas energisch mit Alkohol ab und ziehe es einige Sekunden durch die Bunsenflamme. Die Stelle, an welcher die Serumsäule abgetrennt werden soll, muß soweit von dem unteren Pol des Impfkanals entfernt sein, daß bei dem nun folgenden Durchschlagen des Röhrchens nicht etwa das Paraffin ausfließen kann. Zur Untersuchung benutze ich allein den unteren abgeschnittenen Teil, aus dem ich die feste Serumsäule auslöse. In einer sterilen Petrischale wird diese mit einem sterilen Messer durch Querschnitte in ca. 0·5 *cm* breite Scheiben zerlegt. Bei reichlichem Spirochaetenwachstum sind diese Scheiben milchigweiß getrübt, ist das Aussehen dunkler oder gar schmutziggrau, so finden sich meist bakterielle Verunreinigungen neben Spirochaeten. Spirochaetenhaltige Kulturen verbreiten stets den bereits bei den Mischkulturen erwähnten charakteristischen Geruch. Zur Prüfung des Materials entnehme ich von der Schnitt-

fläche einer Scheibe mit der ausgeglühten Platinöse ein kleines Stückchen festen Nährbodens, sowie ich es eben mit der Öse ausbrechen kann, lege es unter ein Deckglas und drücke es zwischen Fließpapier so breit als möglich. Bei positivem Befund zeigt sich der feste Nährboden bei Dunkelfeldbetrachtung von zahllosen Spirochaeten durchsetzt, die zum größten Teil in lebhafter peitschender Bewegung sind, als wenn sie sich aus ihrem Milieu freimachen wollten; auch Ortsbewegung beobachtet man im festen Nährboden. Wo der Nährboden Risse zeigt, sieht man dunklere Felder, in denen sich Pallidae in außerordentlich lebhafter charakteristischer Bewegung finden, am Rande ragen aus dem festen Nährboden einzelne Exemplare mit dem einen Ende in die dunkleren, wie ein See imponierenden Teile hinein und zeigen mit diesen Teilen eine große Mobilität. Das Spirochaetenwachstum ist in den Scheiben, welche dem Ausgangsmaterial am nächsten sind, am üppigsten und nimmt an Menge nach abwärts ab, ist aber auch noch tief unten in der untersten Kuppe der Kultur meist sehr reichlich.

Hat die Dunkelfelduntersuchung keine bakteriellen Beimengungen gezeigt, so erfolgt die Weiterimpfung in der Weise, daß eine Öse festen Nährbodens schnell in ein frisches Nährröhrchen gestoßen wird, wiederum an der Glaswand entlang bis zur Grenze zwischen oberem und mittlerem Drittel. Nun erfolgt eine kurze Bewegung mit der Nadel nach der Achse des Nährbodens, das Impfmaterial schlüpft aus der Öse und liegt versenkt an der gewünschten Stelle. Überschichtung mit sterilem Paraffinöl, Verschluß durch Wattestopfen und Gummikappe.

Im hellen, gut durchsichtigen Nährboden beobachtet man in den nächsten Tagen vom Impfkanal und besonders vom Impfstück ausgehendes wolkiges, hauchartiges mattes Wachstum, das seitwärts und abwärts fortschreitet. Dieses Wachstum ist in den ersten Tagen bei Tageslicht kaum wahrnehmbar, bei durchfallendem künstlichen Licht, z. B. vor einer elektrischen Glühbirne, aber doch deutlich zu erkennen. In den ersten Tagen entwickelt sich außerdem um das Impfstück ein ganz kleiner Hof, der aus einer zunächst minimalen Verflüssigung des Nährbodens besteht. Am 10. bis 11. Tage ist das Wachs-

tum in der Regel schon weit nach unten fortgeschritten, es ist dichter geworden und dementsprechend etwas leichter zu erkennen. Fig. 3 ist die Zeichnung einer Reinkultur am 11. Tage nach der Impfung. Manchmal findet das Wachstum in den Reinkulturen jedoch erheblich langsamer statt und erst nach 2 bis 3 Wochen reicht die Trübung bis in die untersten Teile der Serumsäule. Bei alten Reinkulturen, etwa von der 5. bis 6. Woche ab, sieht man manchmal Risse im Nährboden, zwischen denen sich etwas Flüssigkeit findet. Manchmal sammelt sich auch auf der Oberfläche allmählich etwas Flüssigkeit an. Diese Flüssigkeit ist hellgelb, vollkommen klar und durchsichtig, unterscheidet sich also schon durch ihr makroskopisches Aussehen von der Verflüssigung in einer Mischkultur, die stets insensiv trüb und schmutziggrau ist. Mikroskopisch enthält die beschriebene Flüssigkeit in älteren Reinkulturen bewegungslose oder wenig bewegliche Spirochaeten und kleinste, eben sichtbare Pünktchen in Brownscher Molekularbewegung. Derartige kleine Gebilde hat auch W. H. Hoffmann erwähnt. Er schreibt darüber: „Auch im Dunkelfeld sieht man in der Reinkultur zwischen den Spirochaeten zahlreiche, lebhaft bewegliche kleinste, runde Körnchen, die viel kleiner sind als Kokken.“ Hoffmann glaubt an die Möglichkeit einer Beziehung dieser Gebilde zu den Spirochaeten. Daß es sich tatsächlich nicht etwa um Mikrokokken handelt, kann man leicht durch die mikroskopische Untersuchung gefärbter Ausstriche sicherstellen.

Waren trotz der Dunkelfeldprüfung, die natürlich keine absolut zuverlässige ist, andere entwicklungsfähige Keime in den bei der Weiterzüchtung verimpften Nährbodenteilchen enthalten oder sind solche etwa bei dem Auslösen der Serumsäule, dem Zerschneiden usw. hinzugetreten, so sieht man im Impfkanal sehr bald Bakterienkolonien und eventuell Verflüssigung. Die „Reinigung“ der Kulturen muß dann in der oben geschilderten Weise weiterhin versucht werden.

Bei der Weiterimpfung reinen Materials müssen immer möglichst große Serien angelegt werden, da bei weitem nicht jedes Röhrchen anzugehen pflegt.

Das Wachstum in einem Röhrchen bezeichne ich als sicher rein, wenn weder im Dunkelfeld noch im gefärbten Ausstrich andere Bakterien neben Spirochaeten gefunden werden, wenn die Weiterimpfung rein gelingt, und wenn die Übertragung auf andere Nährböden kein Wachstum anderer Keime zeitigt.

Über die Herstellung des von mir jetzt verwendeten Nährbodens will ich noch einige Angaben machen.

Ich erwähnte bereits, daß ich keine Gelegenheit habe, durch Venenpunktion unter aseptischen Kautelen das Pferdeblut zu entnehmen. Auch die Vorbereitung der Gegend der Stichwunde beim Schlachten durch mechanische Reinigung und Desinfektion ist hier aus äußeren Gründen nicht durchführbar. Ich muß also von vornherein mit einer erheblichen Verunreinigung des Blutes rechnen und deshalb sorgfältigste Sterilisierung des Serums versuchen. In den gebrauchsfertigen Nährböden finde ich stets Bakterienleiber. Ich sterilisiere jetzt zunächst an 3 auf einander folgenden Tagen je 2 bis 3 Stunden im Wasserbade bei 58°. Darauf kommen die Nährröhrchen 48 Stunden in den Brutschrank und werden dann wiederum 2 mal 2 bis 3 Stunden im Wasserbade bei 58° gehalten. Zum Schlusse wird die Temperatur allmählich erhöht, bis der Nährboden zur gewünschten Festigkeit erstarrt. Von den nunmehr fertig gestellten Nährböden werden nur die verwendet, die nach Prüfung im Brutschrank kein makroskopisch erkennbares Bakterienwachstum zeigen. Die Reaktion des Nährbodens ist schwach alkalisch.

Um die bereits vor der Nährbodenbereitung in das Pferdeblut hineingelangten Keime auszuscheiden, habe ich das Serum vor der Sterilisierung durch Berkefeldfilter gehen lassen, machte aber die Beobachtung, daß in den so gewonnenen Nährröhrchen das Spirochaetenwachstum sehr kümmerlich war oder ganz ausblieb, so daß ich von dieser Vorbereitung des Nährbodens wieder abgegangen bin. Vielleicht ist gerade die Anwesenheit der Bakterien, ihre Umsetzungsprodukte im Nährboden oder ihre Zerfallsprodukte bei der Sterilisierung von großer Wichtigkeit für das Fortkommen der Spirochaeten, und demnach das, was ich für eine Misere bei der Nährbodenbereitung halte, die conditio sine qua non.

Mühlens hatte die Beobachtung gemacht, daß in einem Nährboden, der aus Pferdeserumklümpchen mit überschichteter Bouillon bestand, bei Anwesenheit eines „anscheinend stark sauerstoffbedürftigen Bakteriums“ in den Serumklümpchen die Spirochaeten üppig wuchsen, während andere Röhrchen, die gleichfalls mit Spirochaeten beimpft waren, aber dieses Begleitbakterium nicht aufwiesen, steril blieben. Er isolierte darauf dieses Bakterium, verwendete es bei weiteren Versuchen als „Zusatz III“ und konnte dann auch in gewöhnlicher Bouillon, die er 2 bis 3 Tage vorher mit diesem Zusatz beimpft hatte, Spirochaetenwachstum gewinnen. Welche Rolle dieses Zusatzbakterium spielte, ob es durch seine Sauerstoffaufnahme die notwendige Anäerobiose schuf oder ob es durch seine Stoffwechselprodukte bzw. durch Umsetzung des Nährmediums den Boden für das Spirochaetenwachstum erst brauchbar machte, läßt Mühlens zunächst dahingestellt. Mit Hilfe dieses Zusatzes III erhielt Mühlens auch Spirochaetenwachstum in erstarrtem Kaninchenserum aus einem Kaninchen-Primäraffekt des Hodens, nachdem er vorher wiederholt vergeblich versucht hatte, aus luetischen Veränderungen beim Kaninchen Spirochaetenwachstum zu gewinnen.

Hoffmann glaubt, daß es zur Förderung des Spirochaetenwachstums der Anwesenheit lebender Bakterien bedarf, weil er bei Zusatz sowohl abgetöteter Bouillonkulturen wie von Bouillonkulturen, die durch Bakterienfilter gegangen waren, also nur noch die von ihnen erzeugten Stoffe enthielten, keine nennenswerte Wachstumsförderung beobachtete.

Mein durch das Berkefeldfilter gegangenes Serum enthielt die von den Bakterien erzeugten Stoffe und erwies sich als wenig brauchbar, was Hoffmanns Beobachtungen entspricht; der nicht filtrierte, nur Bakterienleichen führende Nährboden war aber immer ausgezeichnet zur Spirochaetenzüchtung geeignet, so daß es nur auf die Anwesenheit der Bakterienzellen als solcher anzukommen scheint, gleichgültig, ob sie lebend oder tot sind.

Ich stimme jedenfalls mit Mühlens und Hoffmann darin überein, daß bei Gegenwart von Begleitbakterien irgendwo im Nährboden das Spirochaetenwachstum am allerüppigsten ist.

Bei der von mir oben geschilderten Methode der Reinzüchtung ist die Schnelligkeit und Massenhaftigkeit des Pallidawachstums, solange noch im Impfkanal andere Keime gedeihen, viel ausgesprochener als in den vollkommen reinen Kulturen, wenn auch bei diesen das Resultat bezüglich Menge der Spirochaeten nichts zu wünschen übrig läßt.

4. Schlußbetrachtungen über die verschiedenen Züchtungsmethoden. Die Vermehrung der Spirochaete pallida ist nach den obigen Ausführungen auf verschiedenen Nährböden möglich. Auffallend bleibt, daß die verschiedenen Experimentatoren mit gleichen Kulturmedien nicht die gleichen Resultate erhalten konnten. Uhlenhuth hat in Pferdeserum niemals Spirochaetenwachstum erzielen können, ich selbst habe mich wiederholt vergeblich bemüht, in Pferdeserum-Agar nach Mühlens eine Kultur zu gewinnen, Noguchi führt das erstarrte Pferdeserum unter den zur Spirochaetenzüchtung völlig unbrauchbaren Kulturmedien auf und hält den Zusatz von frischen Gewebsstücken zu seinem Nährboden für das punctum saliens. Für meine Mißerfolge mit Pferdeserum-Agar habe ich keine Erklärung; vielleicht ist mir die Herstellung des richtigen, den Spirochaeten zusagenden Nährbodens nicht gelungen.

Daß Noguchi keine Mischkulturen in Pferdeserum erhalten hat, liegt daran, daß er als Ausgangsmaterial ausschließlich syphilitisches Substrat vom Kaninchen benutzte. Die Züchtung aus tierischem Material in reinem Pferdeserum scheint in der Tat großen, noch nicht aufgeklärten Schwierigkeiten zu begegnen, sie ist aber nicht unmöglich, wie ich durch 2 positive Versuche, von denen schon weiter oben berichtet worden ist, nachgewiesen habe, und was auch Hoffmanns erfolgreiche Rückimpfung auf Pferdeserum aus mit Reinkultur erzeugter Orchitis beim Kaninchen beweist. Es mag sein, daß die aus tierischem Gewebe stammenden Pallidae bei Anwesenheit von Stückchen frischer Niere oder Hoden normaler Kaninchen im Nährboden zuverlässiger und besser gedeihen, unbedingt notwendig ist solch Zusatz aber sicherlich nicht. Meine Kulturen ließen jedenfalls bezüglich Üppigkeit des Pallidawachstums bei der Methode Schereschewskys nichts zu wünschen übrig.

Noguchis Behauptung, daß weder Bruckner und Galasesko, noch ich selbst, „eine zweite Fortzüchtung der Stämme in irgend einem Nährboden erhalten konnten", entspricht nicht den Tatsachen. Bereits in einer Publikation in der Deutschen medizinischen Wochenschrift 1911 Nr. 15 habe ich meine Technik der Weiterzüchtung einer Stammkultur kurz beschrieben. Daß die Gewinnung beliebiger Pallida-Generationen leicht und fast regelmäßig gelingt, hat schon vorher Schereschewsky angegeben und in der Möglichkeit der Übertragung von Röhrchen zu Röhrchen gerade den großen Vorzug des Pferdeserum-Nährbodens gegenüber dem Aszites-Nährboden erblickt.

Die Deutung der erfolgreichen Übertragung von Kulturspirochaeten auf Kaninchen durch Bruckner und Galasesko und durch mich im Gegensatz zu den vergeblichen Versuchen von Mühlens und Schereschewsky dahin, daß „die lebenden Spirochaeten sich wirklich in dem Nährboden vermehrten, aber ihre Virulenz nur Dank der Anwesenheit von Schankergewebe noch gut erhalten haben", wird Noguchi nicht aufrecht erhalten können, wenn er erfährt, daß die experimentelle Hodensyphilis beim Kaninchen durch Bruckner und Galasesko nicht — wie er irrtümlich berichtet — mit einer „ersten Generation im Schereschewskyschen Nährboden, noch die originalen syphilitischen Gewebe enthaltend" gewonnen wurde, sondern mit einer zweiten Kulturpassage, und daß auch von mir mit höheren Kulturgenerationen erfolgreich geimpft worden ist.

Die Pathogenität der gezüchteten Spirochaete kann deshalb unmöglich durch die Anwesenheit solchen Gewebes bedingt sein, ebensowenig wie die Züchtungsmöglichkeit überhaupt davon abhängig ist.

Mühlens und Hoffmann haben in ihren Arbeiten über manche interessante Kultivierungsversuche auf den verschiedensten Nährböden berichtet, von denen ich nur die erfolgreiche Züchtung in reinem Agar ohne Serumzusatz anführen will. In diesem Medium wuchs die Pallida, ohne eine Trübung hervorzurufen und ohne den „fauligen" Geruch zu verbreiten. Diese beiden Eigenschaften sind also — wie Hoffmann schließt —

an das Serum gebunden. Eine beliebig wiederholte Übertragung auf Agar war aber nicht möglich. Auch die erfolgreiche Verwendung eines von Martini angegebenen Nährbodens, der aus Bouillon mit defibriniertem Rinderblutzusatz besteht, sei erwähnt. Hierin wuchsen die Spirochaeten nach 8 Tagen als „1 bis 2 *mm* hohe weißliche Schicht".

Ich selbst machte noch folgende Beobachtung: Um spirochaetenhaltigen Pferdeserumnährboden auf „Reinheit" zu prüfen, versenkte ich Stückchen desselben u. a. in Nährbouillon; einen Teil der beschickten Röhrchen überschichtete ich hoch mit sterilem Paraffinöl, um anaërobe Bedingungen zu schaffen. Stets fand ich schon nach 2 Tagen in der Bouillon bei Dunkelfelduntersuchung zahlreiche lebhaft bewegliche Spirochaeten. Ich glaube nicht, daß diese in der Bouillon gewachsen waren, neige vielmehr zu der Auffassung, daß es sich um Exemplare aus dem versenkten spirochaetenreichen Serumstückchen handelte. Immerhin beweist diese Beobachtung, daß sich die Pallida in Bouillon eine Zeitlang im lebenden Zustand hält.

Zusammenfassend kann ich sagen: Die Züchtung der Syphilisspirochaete auf künstlichem Nährboden in Mischkultur ist verhältnismäßig leicht, die Isolierung ist jedoch nach allen bisher erfolgreich ausgeführten Methoden mit ziemlich großen Schwierigkeiten verbunden. Die optimalen Bedingungen zur Reinzüchtung des Syphiliserregers sind noch nicht endgültig festgestellt. Es ist nicht einmal sicher, daß die Spirochaete pallida streng anaërob ist; jedenfalls geht aus einer Reihe von Beobachtungen hervor, daß der einmal kulturell gewonnene Erreger gegen Sauerstoff keineswegs übermäßig empfindlich zu sein scheint.

5. Zur Morphologie der Kulturspirochaete. Form und Beschaffenheit der Spirochaete pallida schildern Schaudinn und E. Hoffmann kurz nach ihrer Entdeckung (vergl. Deutsche med. Wochenschr. 1905, Nr. 18) wie folgt:

„Die in den syphilitischen Krankheitsprodukten gefundene Spirochaete pallida stellt ein äußerst zartes, im Leben sehr schwach lichtbrechendes, lebhaft bewegliches (die Bewegungen im Leben sind die für die Gattung Spirochaete gegenüber Spirillum charakteristischen 3 Arten: Rotation um

die Längsachse, Vor- und Rückwärtsgleiten und Beugebewegungen des ganzen Körpers) und daher schwer wahrnehmbares[1]) spiralig gewundenes, lang fadenförmiges, an den Enden zugespitztes Gebilde dar. Die Länge schwankt zwischen 4 und 14 μ, die Breite ist fast unmeßbar dünn, höchstens bis zu $^1/_4$ μ bei den dicksten Individuen. Die Zahl der Windungen wechselt zwischen 6 bis 14. Charakteristisch für diese Art gegenüber der anscheinend nur auf der Oberfläche der Genitalien und in den oberflächlichen Gewebsschichten bei Genitalläsionen lebenden Spirochaeten ist die Art der Windungen. Sie sind bei der Spirochaete pallida nicht nur stets zahlreicher, sondern auch sehr eng und steil, korkzieherartig, während sie bei der Spirochaete refringens flach, weit, wellenartig erscheinen. Außer der Differenz im Lichtbrechungsvermögen und in der allgemeinen Konfiguration fällt die Spirochaete pallida neben allen bisher bekannten Spirochaeten durch ihre außerordentlich geringe Färbbarkeit mit allen den Farbstoffen auf, welche sonst mit Erfolg zur Darstellung dieser Mikroorganismen verwendet werden."

Die Färbung gelang den Entdeckern bekanntlich am deutlichsten mit der sehr intensiven Giemsaschen Eosin-Azurmischung, mit der auch heute noch am besten gefärbte Präparate hergestellt werden. Dieser Beschreibung der morphologischen Beschaffenheit des Syphiliserregers ist auch jetzt nichts Wesentliches hinzuzusetzen.

Ich stehe nicht an, zu behaupten, daß Kulturspirochaeten, die im lebenden Zustande beobachtet alle oben geschilderten Eigentümlichkeiten ausnahmslos aufweisen, eben Spirochaetae pallidae sind. Die Spirochaete refringens ist doch wirklich so ganz anders gestaltet, daß dem geübten Untersucher kaum Verwechslungen unterlaufen werden. Die so oft zitierten „Übergangsformen" mögen ohne weiteres zum Refringenstyp gerechnet werden. Auch die Möglichkeit einer Verwechslung mit der Spirochaete dentium ist unwahrscheinlich, falls das Ausgangsmaterial, wie bei allen meinen Versuchen, nicht aus Veränderungen im oder am Munde stammt. Die einzige Spirochaete, die von der Pallida überhaupt kaum zu unterscheiden sein soll, die Spirochaete pertenuis, die Erregerin der Framboesia tropica, kommt in unseren Gegenden kaum je in Frage.

Bei den Kulturspirochaeten haben wir es außerdem stets mit Unmengen gleicher Exemplare zu tun, so daß wir nicht in die Verlegenheit kommen, entscheiden zu müssen, ob unter

[1]) d. h. im frischen Deckglaspräparat bei gewöhnlicher Beleuchtung.

allen möglichen Spirochaetenformen diese oder jene eine Pallida ist, wie es bei Abstrichpräparaten aus Mundläsionen der Fall zu sein pflegt.

Form und Bewegung der Kulturspirochaeten können nur zu der Zeit richtig beurteilt werden, wo die Kultur auf der Höhe ihrer Entwicklung steht. Dann gleichen sie vollkommen denen sicherer Pallidae aus frischem menschlichen Material unmittelbar nach der Entnahme. Die Ortsbewegung kann natürlich im festen Nährboden keine so ausgesprochene sein, wie außerhalb desselben, obgleich sie auch dort zu beobachten ist. Wo die Spirochaeten in Rissen im Nährboden freiliegen, zeigen sie die rotierenden, oft wie in Gelenken knickenden lebhaften Bewegungen und ziehen wie Fischschwärme rasch durch das Gesichtsfeld. Die Beweglichkeit im wachsumrandeten Dunkelfeldpräparat bleibt nicht immer gleich lange Zeit bestehen. Im Präparat einer aus tertiärem Material gewonnenen Mischkultur habe ich die Spirochaeten während 28-tägiger Beobachtung charakteristisch beweglich gefunden; allerdings ließ die Intensität der Bewegungen gegen Ende der Beobachtungszeit erheblich nach. 3 bis 4 Tage lang kann man fast regelmäßig Beweglichkeit außerhalb der Kultur beobachten. Diese Zeit läßt sich verlängern, wenn die Präparate im Brutschrank aufbewahrt werden. Im festen Nährboden liegen die Spirochaeten manchmal so dicht bei- und durcheinander, daß das Ganze den Eindruck eines wimmelnden Haufens macht. Dabei sind die einzelnen Exemplare gerade gerichtet, verhältnismäßig selten sieht man Pallidae, die sich zu einem Ring geschlossen haben oder eine Schleife bilden. Auffallend häufig konnte ich die bekannten V- und Y-Formen beobachten, deren Gabeln heftig gegeneinander schlugen; auch zopfartige Verflechtung von Spirochaeten, sowie sich knäuelförmig zusammenballende und rapide wieder zur Geraden aufrollende Exemplare wurden gesehen.

Eine Beobachtung scheint mir noch erwähnenswert. In freien Stellen des Präparats, wo sich die Spirochaeten zunächst einzeln lebhaft durcheinander bewegen, tritt nach einigen Tagen nach Abnahme der Beweglichkeit Bildung großer Haufen ein (Agglomeration oder Agglutination), nur einzelne Exemplare

bleiben frei liegen. Bild 2 auf Tafel VI zeigt solche Haufenbildungen am 5. Tage nach Anfertigung des Präparats.

Große Unterschiede in der Länge der einzelnen Exemplare derselben Kultur habe ich nicht beobachtet. Die Zahl der Windungen differierte kaum um mehr als 6 bis 8; zeitweise hatte ich Präparate, in denen die Erreger wie abgemessen gleichlang schienen. Ungewöhnlich lange Spirochaeten mit 36 und noch mehr Windungen sah ich häufig in Kulturen von 12 bis 15 Tagen Alter und dann meist in sehr großer Zahl im Präparat. Obgleich ich solche Exemplare lange Zeit beobachtete, gewann ich nie den Eindruck, daß sie sich aus aneinander gereihten kürzeren Individuen zusammensetzten.

Zu der Frage, ob die Spirochaeten sich durch Quer- oder Längsteilung vermehren, kann ich nicht Stellung nehmen da ich einen Teilungsvorgang nie unter meinen Augen vor sich gehen sah. Der Umstand, daß die ungewöhnlich langen Formen in den Kulturen nach einigen Tagen größtenteils wieder verschwinden, deutet auf Querteilung hin. Es scheint mir wenigstens gezwungen, anzunehmen, daß lange Exemplare durch Aneinanderrücken kürzerer Individuen nur zu gewissen Zeiten zu Stande kommen, und daß dieses Phänomen dann auch gleich bei der Mehrzahl der in der Kultur enthaltenen Spirochaeten auftritt, dazu noch im festen Nährboden, der doch einer zielbewußten Bewegung der Einzelexemplare nicht unbedeutenden Widerstand entgegensetzt.

Die nach Giemsa gefärbten Kulturspirochaeten zeigen den charakteristischen rötlichen Farbenton, der im Gegensatz zu dem mehr bläulichen Farbton anderer Spirochaetenarten von differentialdiagnostischer Bedeutung ist. Während im lebenden Präparat die gerade gerichteten Exemplare vorwiegend beobachtet werden, finden sich im gefärbten Ausstrich die kühnsten Formen. Ich habe dieselben Präparate, die ich sorgfältigst im Dunkelfeld beobachtet hatte, nachträglich nach Giemsa gefärbt, und war oft erstaunt, wie sonderbar aussehende Gebilde ich wiederfand, die ich „lebend“ nicht gesehen hatte. Ganz abgesehen von allen nur denkbaren Verbiegungen und Verschlingungen waren bisweilen manche Exemplare ganz regelwidrig flach gewunden und selbst zu wenig gekrümmten, fast

geradlinigen Fäden (formes rectilignes) verwandelt; allerdings zeigten auch diese den für die Pallida charakteristischen rötlichen Farbton. Derartige Formveränderungen können nur beim Trocknen bzw. beim Fixieren der Ausstriche zu Stande gekommen sein. Trotzdem ich also weiß, daß so aussehende Spirochaeten Pallidae sein können, würde ich mich doch scheuen, auf Grund eines Präparats, das aus einer verdächtigen Veränderung zum Zwecke des Syphilisspirochaetennachweises hergestellt worden ist, bei ausschließlicher Anwesenheit solcher Formen die Diagnose Lues zu stellen.

An den Spirochaetenfäden finden sich bisweilen knötchen- oder spindelförmige, gut und gleichmäßig tingierte Verdickungen, die entweder irgendwo im Verlauf oder an einem Ende sitzen. Auch im Dunkelfeld sah ich derartige „Auftreibungen". Solche Gebilde des Spirochaetenleibes hat zuerst Herxheimer beschrieben und als Kerne und Zentrosomen gedeutet. Noguchi beobachtet sie ebenso wie ich in Reinkulturen. Wohl zu unterscheiden davon sind größere und ungleichmäßig gefärbte kuglige Stellen im Verlauf der Pallida, die wahrscheinlich Aufrollungen oder Schleifenbildungen entsprechen.

C. Tierversuche mit Kulturspirochaeten.

Als ich gemeinsam mit Herrn Prof. Grouven die ersten Impfversuche beim Tier mit Pallida-Mischkulturen anstellte, lagen bereits Berichte über erfolglose Impfungen bei Affen verschiedenster Art, auch Anthropoiden, sowie bei Kaninchen und Mäusen von Schereschewsky, Mühlens und Levaditi vor, so daß die Tierpathogenität der Kulturspirochaeten überhaupt bezweifelt wurde. Bei den Versuchen dieser Autoren war zunächst eine örtliche Haftung des Virus an Auge, Haut (meist Augenbraue) oder Hoden beabsichtigt; ohne Resultat. Im Jahre 1910 gelang es aber Bruckner und Galasesko, durch Impfung mit Schereschewskyscher Spirochaete-Pallida-Kultur (2. Passage) in den rechten Hoden eines Kaninchens nach einer Inkubationsdauer von 60 Tagen in beiden Hoden Infiltrate zu erzeugen; die Hoden waren von einem „gelatinösen

Ödem" eingehüllt, in welchem sich durch Punktion große Mengen Pallidaspirochaeten nachweisen ließen. Durch diesen Versuch war die Pathogenität künstlich gezüchteter Spirochaeten erwiesen, das Auftreten von Infiltraten im nichtgeimpften linken Hoden deutete außerdem auf eine Generalisierung der Lues beim Versuchstier hin. Im April 1911 war ich selbst in der Lage, über „syphilitische Allgemeinerkrankung beim Kaninchen durch intrakardiale Kulturimpfung" zu berichten. Bei dieser, meiner ersten erfolgreichen Impfung mit einer Mischkultur hatte ich eine erste Generation benutzt. Ich machte mir damals selbst den Einwand, daß ich meinen Erfolg vielleicht nicht im Nährboden neuentstandenen Spirochaeten zu verdanken hatte, sondern nur den im Pferdeserum lebend und virulent gebliebenen Spirochaeten des Ausgangsmaterials. Diese Deutung hatte aber von vornherein nicht viel Wahrscheinlichkeit für sich. Daß in der Ausgangskultur wirklich zahllose Pallidae neu entstanden waren, ging aus der Tatsache hervor, daß in dem verflüssigten Nährboden in jeder Öse entnommenen Materials zahllose Spirochaeten gefunden wurden, Mengen, wie sie selbst bei den spirochaetenreichsten Präparaten von menschlichem Substrat nicht annähernd beobachtet werden. Zudem hatte ich bei meiner ersten erfolgreichen Impfung das Ausgangsmaterial am Boden der Kultur nicht benutzt, auch gar nicht benutzen können, weil die feine Injektionsnadel für den Detritus nicht durchgängig war. Ich glaubte deshalb, für die Erklärung meines ersten Impferfolgs im Gegensatz zu den zahlreichen Mißerfolgen anderer Autoren 3 Punkte in Betracht ziehen zu müssen: 1. die von mir verwandte große Menge des Impfmaterials, 2. die hohe Virulenz des Impfmaterials, 3. die intrakardiale Impfmethode.

Im Oktober 1911 konnte ich meinem ersten Bericht über erfolgreiche Kulturimpfung beim Kaninchen einen weiteren über Infektion (auch mit höheren Kulturgenerationen) von 5 anderen Tieren folgen lassen.

Auf Grund meiner heutigen Erfahrungen an einer großen Zahl von Impfversuchen am Tier halte ich die Verabfolgung möglichst großer Mengen Impfmaterials für das Wesentlichste zum Erfolg. Die Virulenz des Impfmaterials wird immer erst der Impfeffekt erweisen. Die gewählte Art der Einverlei-

bung des Virus in den Tierkörper wird die Aufgabe erfüllen müssen, möglichst viele Spirochaeten auf einmal dem Organismus zuzuführen, eine Forderung, der die direkte Einbringung des Impfmaterials in den Blutkreislauf am ehesten zu genügen scheint. Dementsprechend sind einige von mir mit Kulturspirochaeten ausgeführte Hautimpfungen beim Kaninchen ergebnislos verlaufen. Dagegen haben eine Hodenimpfung (bei einem Makakus) und verschiedene Impfungen in den Blutkreislauf (intrakardial und in die Leber) zu klinisch einwandfreien luetischen Erkrankungen mit positivem Spirochaetenbefund geführt. 2 intravenöse Impfungen waren negativ.

Bei den Hodenimpfungen habe ich das Impfmaterial in der Regel in das Parenchym des rechten Hodens injiziert, einige Male auch unter die Tunica vaginalis propria.

Die Impfungen in den Blutkreislauf führte ich meist nach der von Uhlenhuth und Mulzer angegebenen Methode intrakardial aus.

Eine Reihe von Impfungen führte Herr Privatdozent Dr. Igersheimer teilweise mit mir zusammen in die Carotis communis aus. Bei dieser Impfmethode sollten in erster Linie Erscheinungen am Auge hervorgerufen werden. Soweit diese Impfungen zu Allgemeinerscheinungen führten, sind sie im folgenden verwertet. Eine dritte Impfmethode zum Zwecke der Überschwemmung des Blutkreislaufes mit Spirochaeten war schließlich die Injektion des Impfmaterials in die Leber (Prof. Dr. Grouven). Auf diese Weise schien die Möglichkeit gegeben, den Erreger in den Leberkreislauf und auf diesem Wege in die V. cava inferior zu bringen. Wir hofften dadurch Tiermaterial zu sparen, dasselbe wie bei der intrakardialen Impfung, die uns viele Kaninchen kostet, zu erreichen und hatten außerdem den Ausblick, in der für die Ansiedlung von Spirochaetae pallidae bekanntlich günstigen Lebersubstanz wichtige Veränderungen zu finden.

Die von uns geübte intrakardiale Impftechnik ist folgende:

Die möglichst kräftig entwickelten, wenigstens 4 Monate alten Tiere werden in Rückenlage aufgespannt. In der Herzgegend werden die Haare abrasiert oder mit der Schere so weit

entfernt, bis die Thoraxhaut frei sichtbar wird. Durch Inspektion oder Palpation wird die Stelle der stärksten Herzpulsation aufgesucht und nach Desinfektion der Haut genau am linken Sternalrand in dem zugehörigen Interkostalraum mit einer mit feinster Kanüle armierten und vorher mit dem Impfmaterial gefüllten Rekordspritze eingestochen. Ist der linke Ventrikel richtig getroffen, so bewegt sich die Spritze in der Hand mit den Kontraktionen der linken Herzkammer, beim Aspirieren tritt Blut in die Spritze. Sehr langsam wird nun der Inhalt der Spritze injiziert. Die Injektion einer Luftblase wird natürlich sorgfältigst vermieden. Selbst bei wohlgelungener Injektion geht ein großer Teil der Versuchstiere während oder alsbald nach der Einspritzung zu Grunde; meist infolge Blutung in den Herzbeutel, die auch bei Verwendung allerfeinster Kanülen oft nicht ausbleibt. Schwerer Kollaps nach der Injektion wurde meist beobachtet, hielt in einem Falle 2 Stunden an und wurde schließlich durch subkutane Äthergaben beendet.

Die Leberimpfungen wurden von Herrn Prof. Grouven perkutan durch Einstich dicht unterhalb des rechten Rippenbogens ausgeführt, in einem Falle wurde die Leber durch Laparotomie freigelegt und in die Lebersubstanz tief injiziert. Dieses Tier, das mit 1 *ccm* einer sehr spirochaetenreichen Mischkultur III. Generation geimpft war, kam jedoch schon nach 11 Tagen zum Exitus, obgleich die Operationswunde reaktionslos verheilte. Auf der Oberfläche der Leber fand sich entsprechend der Injektionsstelle ein pfennigstückgroßer Abszeß, durch dessen Wand schmutzig graubrauner Inhalt durchschien. Bei Inzision entleerte sich eine Flüssigkeit gleicher Färbung, in der im Dunkelfeld keine Spirochaeten nachgewiesen werden konnten. Bei einem anderen perkutan in die Leber mit Mischkultur II. Generation geimpften Kaninchen, das am 15. Tage nach der Injektion verendete, fanden sich an Leber und Peritoneum keinerlei makroskopische Veränderungen; das Impfmaterial war also, ohne eine örtliche Reaktion hervorzurufen, in den Blutkreislauf übergegangen. Die gleiche Beobachtung wurde bei dem unten erwähnten Kaninchen 55 gemacht.

Das zu den verschiedenen Impfungen verwendete Material wurde stets unmittelbar vor der Injektion auf Reichhaltigkeit,

Typ und Beweglichkeit der Spirochaeten geprüft. Wir injizierten soviel als möglich. Bei unserem ersten erfolgreich geimpften Kaninchen gaben wir 4 (!) *ccm* verflüssigter Mischkultur intrakardial. Später sind wir bei Impfungen in die Blutbahn wegen der großen Tierverluste bis auf $^1/_2$ *ccm* heruntergegangen, nicht selten auf Kosten des Erfolges.

Außer Kaninchen wurde von uns ein Makakus rhesus in den Hoden mit Kulturspirochaeten geimpft, dessen Krankengeschichte weiter unten folgt, und ferner ein junges Kätzchen (intrakardial), bei dem wir jedoch innerhalb 9 Monaten keine Krankheitserscheinungen beobachtet haben.

Ich lasse zunächst die Protokolle über die erfolgreich geimpften Tiere folgen.

Kaninchen 51. Albino, ausgewachsen, weiblich, zur Zeit tragend 1./XII. 10. mit 4 *ccm* spirochaetenreicher verflüssigter Kultur B 2 intrakardial geimpft. Die Aspiration des Bodensatzes der Kultur in die Injektionsspritze wird vermieden. 10./XII. 10. wirft 4 ausgetragene kräftige Albinos. 2./III. 11. Das Tier zeigt an der Innenfläche beider Löffel ein kleinpapulöses, spärliches Exanthem, ein derbes, papulöses Infiltrat an der Druckstelle des Nummerknopfrandes im Ohr, strichförmige Infiltrate im Verlauf einzelner feiner Ohrvenen (Spirochaetenembolie?). Im Dunkelfeld zeigt das Reizserum einer Papel Spirochaetae pallidae, ebenso Ausstriche nach Giemsa gefärbt, auch im Schnitt (Silberimprägnation) Spirochaetae pallidae nachweisbar. Bis 20./III. 11. status idem. An diesem Tage wird festgestellt: Vermehrung der papulösen Effloreszenzen auf der Innenfläche beider Löffel, fortgeschrittene strichförmige Infiltrate im Verlauf der Ohrvenen, zahlreiche bis linsengroße derbe Infiltrate am freien Rand beider Löffel, ganz vereinzelte stecknadelkopfgroße, zum Teil leicht schuppende Papeln auch auf der Außenseite der Löffel. An der linken Löffelwurzel ein pfennigstückgroßes, mit dicker Kruste bedecktes Infiltrat. Auf dem Nacken des Tieres in einem Gebiet von Kleinhandtellergröße Haarausfall, daselbst ein klinisch typischer ulzero-serpiginöser Herd, vereinzelte papulo-pustulöse Effloreszenzen auf dem ganzen Rücken. Im Ausstrich verschiedener Effloreszenzen sowohl im Dunkelfeld wie im Giemsapräparat Spirochaetae pallidae. Am selben Tage wird uns vom Wärter der Tiere mitgeteilt, daß er bei Reinigung des Käfigs am 18. März im Unrat verscharrt Föten gefunden hat, die er zu unserem lebhaften Bedauern in Unkenntnis der eventuellen Wichtigkeit dieses Fundes beseitigt hat. 29. März. Erscheinungen in Rückbildung, Krusten überall abgefallen. Eine Anfang März in erstarrtes Pferdeserum versenkte Papel der Löffelhaut hat kein Spirochaetenwachstum gezeitigt. Die minimale Verflüssigung der obersten Nährbodenschicht enthielt bei Dunkelfeldbetrachtung nur kleinste spärliche Kokken. 6./IV. 11. Beginn mit Vakzi-

nationsversuchen.[1]) 7./IV. 11. Im Dunkelfeldpräparat von der Druckpapel im Löffel unbewegliche und gut bewegliche durchaus typische Pallidae. Anfang Mai 1911 frei von Erscheinungen. 19./VI. 11. Rezidiv, namentlich wieder in Form eines papulösen Exanthems und strichförmiger bis bleistiftdicker Infiltrate im Verlauf von Löffelvenen und einzelner papulopustulöser Effloreszenzen auf dem Rücken. Anfang August 1911 waren die Rezidiverscheinungen sämtlich verschwunden. Das Tier hat während der Beobachtungszeit mehrere Male geworfen. Nur die 10 Tage nach der Impfung geborenen Jungen sind am Leben geblieben, während bei allen späteren Würfen die Nachkommen entweder tot geboren wurden oder bald nach der Geburt starben. In den inneren Organen einiger untersuchter totgeborener Tiere konnten keine Spirochaeten nachgewiesen werden. Die Wassermannsche Reaktion (nach Blumenthal) war am 18./IX. 11., 15./XII. 11. und 7./II. 12. negativ.

Kaninchen 53. Albino, weiblich, 4 Monate alt. 1./IV., 3./IV., 5./IV. 11 vakziniert[1]). 9./IV. 11 mit $1^1/_2$ *ccm* spirochaetenreicher Stammkultur Le B. intrakardial geimpft. Es wird angenommen, daß sich das Tier zur Zeit der Impfung in der sogen. negativen Phase befindet und deshalb einer Impfung leichter zugängig ist. Das mit der gleichen Menge derselben Kultur intrakardial geimpfte Kontrolltier geht unmittelbar nach der Impfung ein. 1./V. 11. Kleinpapulöses Exanthem an der inneren Löffelhaut. 22./V. 11. Exanthem bis auf unbedeutende Reste geschwunden. 30./V. 11. Klinisch typische Iritis specifica sinistra! Augenbefund (Privatdozent Dr. Igersheimer): Ziliare Injektion, hochgradige Hyperämie der Irisgefäße. Pupille enger als rechts, ausgefüllt von dünnem, teilweise noch am Pupillarrand adhärierendem Exsudat. Pupillenreaktion vorhanden. Ophthalmoskopisch: Retinalgefäße vielleicht etwas mehr gefüllt als rechts, sonst o. B., auch in der Peripherie. Rechtes Auge normal. 31./V. 11. Ziliare Injektion noch vorhanden, Hyperämie der Irisgefäße bedeutend zurückgegangen. Von der Exsudatmembran besteht nur noch ein dreieckiger Rest im obersten Teil der Pupille, z. T. noch adhärierend mit dem Pupillarrand (s. Tafel VII, Fig. 4). Ophthalmoskopisch: normal, auch in der weitesten Peripherie. Keine Präzipitate. Rechtes Auge: völlig normal. Am linken Auge in der oberen Übergangsfalte eine blutig imbibierte Partie ohne oberflächlichen Defekt sichtbar. Demonstration im Verein der Ärzte zu Halle a. S. Am selben Abend linker Bulbus von Igersheimer enukleiert. 18./VII. 11. Starker Haarausfall. 26./VII. 11. An der linken Löffelwurzel überlinsengroßes flaches braunrotes Infiltrat mit zentraler Borke. 3./VIII. 11. Infiltrat wieder verschwunden. 14./IX. 11. W. R. positiv (nach Blumenthal). 20./X. 11. Exitus. Bei der Obduktion wurde an den inneren Organen nichts Pathologisches gefunden.

Die eine Hälfte des enukleierten Bulbus wurde von Igersheimer nach Fixierung in Formol histologisch untersucht, die andere Hälfte

[1]) Vgl. Grouven: Deutsche med. Wochenschr. 1911. Nr. 36.

untersuchte ich selbst auf Spirochaeten mittelst Silberimprägnierung nach Levaditi.

Igersheimer beschreibt den histologischen Befund wie folgt:

„Auf Serienschnitten konnte ich in der Iris eine Infiltration mit Lymphozyten feststellen und diese lymphozytären Einlagerungen fanden sich auch in ähnlicher Menge im Ziliarkörper, im Ligamentum pectinatum und der Zonula Zinni. Sowohl im Winkel der vorderen, als auch der hinteren Kammer waren mäßige Mengen von Lymphozyten aus dem Gewebe ausgetreten. Abgesehen von den Lymphozyten fanden sich in der Iris noch „Kolloidzellen", die möglicherweise Beziehungen zu den Plasmazellen besitzen. Ein geringes Transsudat am Pupillenrand der Iris sowie auf ihrer Vorderfläche vervollständigte das Bild der akuten, im Rückgang begriffenen Entzündung. Interessanter Weise hatte die Entzündung offenbar nicht allein Iris und Corpus ciliare betroffen, sondern es fanden sich auch mehrere retinale, durch einen Flüssigkeitserguß entstandene Herde. Diese Herde lagen zumeist peripher, einer aber auch direkt an der Papille. Sie sind charakterisiert durch ein Auseinanderweichen der Körnerschichten, durch einen Zerfall der Stäbchen und Zapfen und hier und da durch Infiltration von Lymphozyten in die Ganglienzellenschicht. Auf der Innenfläche der Retina sind, besonders wieder peripherwärts, zahlreiche Lymphozyten anzutreffen.

In mehreren Schnitten sind auch tiefe Gefäße, die in das Hornhautparenchym hineinreichen, nachzuweisen, doch lasse ich es dahingestellt, ob es sich dabei um eine beginnende parenchymatöse Keratitis handelt."

In den Levaditi-Präparaten fand ich eine Spirochaete in der Sklera, deren Echtheit kaum zu bezweifeln ist, während ich sonst keine einwandfreien Befunde erheben konnte.

Kaninchen 55. Albino, weiblich, $4^1/_2$ Monate alt.

19./IV. 1911. 2 *ccm* spirochaetenreiche Stammkultur Kr. 1 perkutan in die Leber injiziert. 3./V. An der Einstichstelle der Bauchhaut kleinpapulöse Erhabenheit. 22./V. Auf der Innenfläche beider Löffel oberflächlich schuppende Papeln, im Dunkelfeld Spirochaetae pallidae +. Durch die Bauchdecken fühlt man unterhalb des rechten Rippenbogens — entsprechend der Gegend der Injektion — mehrere erbsen- bis pflaumenkerngroße, weiche verschiebliche Tumoren. 2./VI. In beiden Leisten kleinerbsengroße Lymphdrüsen. 12./VI. Lymphdrüsen nicht mehr palpabel, Tumoren unterhalb des rechten Rippenbogens unverändert. Getötet. Die gefühlten Tumoren entsprechen vergrößerten Netzdrüsen mit zentraler Erweichung, in denen sich bei Silberimprägnation keine Spirochaeten nachweisen lassen. Leber ohne nachweisbare Veränderungen, Peritoneum überall glatt und spiegelnd, also Residuen der Injektion nicht zu finden.

Kaninchen 57. Weiblich, 5 Monate alt.

22./IV. 1911. Mit 2 *ccm* Kultur M. 2. zweite Generation intrakardial geimpft. Die Kultur war am 9. Januar angelegt, war also bei der Verimpfung bereits $4^1/_2$ Monate alt. Nach der Injektion 2-stündiger schwerer Kollaps. 10./V. — also nach 18 Tagen — auf der Bauchhaut 3 talergroße, ulzerös zerfallene Infiltrate mit wallartig aufgeworfenen Rändern. Im

Ausstrich aus Randinfiltrat (Giemsafärbung) spärliche, aber in der Form einwandfreie Pallidae. Haarausfall, starke Abmagerung. 17./V. Im Verein der Ärzte, Halle a. S., demonstriert. 27./V. In der linken Leiste wie im Rosenkranz aneinandergereihte, erbsen- bis bohnengroße Lymphdrüsen von Luftkissenkonsistenz. Ulzerationen unter Narbenbildung fast verheilt. 16./VI. Drüsenschwellung geringer. 4./VII. In der linken Leiste nur noch eine deutlich geschwollene Drüse. Mitte September war eine Lymphdrüsenschwellung nicht mehr nachweisbar; Mitte November wurden wieder deutlich geschwollene Drüsen in der linken Leiste gefühlt. Das Tier war dabei in gutem Ernährungszustand, das Fell dicht behaart. 8./I. 1912. Fast vollkommener Haarausfall in der Nackengegend, daselbst ca. fünfmarkstückgroßes ulzero-serpiginöses, mit Krusten bedecktes Infiltrat, 2 papulöse Infiltrate an der Druckstelle des Nummerknopfrandes im linken Löffel, von denen das eine etwas ulzeriert ist, typische spärliche papulöse Effloreszenzen auf der Außenseite des rechten Löffels. An der Mitte des rechten oberen Augenlides beginnt eine Einkerbung nach oben außen und von dieser Stelle an fehlt der ganze mediale Lidrand, an seiner Stelle eine Narbe, die in die Übergangsfalte sich fortsetzt. Auge im übrigen blaß. Allgemeines struppiges Aussehen. In keiner der beschriebenen Veränderungen gelingt der Spirochaetennachweis im Dunkelfeld. 9./II. Das serpiginöse Infiltrat in der Nackengegend ist bis auf eine pfenniggroße krustöse Stelle zurückgegangen (Spirochaeten: —). Der fast totale Haarausfall besteht daselbst noch. Auf der Rückenhaut stehen nur noch spärliche Haare, die Haut selbst ist trocken, schuppend, erscheint ekzematös, die papulösen Infiltrate am linken Löffel sind als solche noch zu erkennen. Das Tier ist hochgradig abgemagert, frißt aber gut. Am rechten Auge haben sich folgende Veränderungen entwickelt: Oberes Lid: noch immer die Auskerbung nach oben außen und der fehlende mediale Lidrand wie früher. Die Haut medial vom inneren Augenwinkel haarlos und leicht narbig. Die Plika sehr stark infiltriert und injiziert. Zwischen Plika und Oberlid eine gelbweiße Masse, die z. T. der Gegend der Übergangsfalte aufgelagert ist, z. T. nekrotisches Gewebe darstellt. Anscheinend handelt es sich um einen ulzerativen Prozeß im medialen Teil der oberen Übergangsfalte. Conjunctiva bulbi stark injiziert. Der ganze mediale Teil der Hornhaut bis weit in die temporale Hälfte hinein wird durch eine graugelbe, in den oberflächlichen Schichten etwas abziehbare Partie dargestellt (eigenartig infiltrierte Ulzeration). Der noch durchsichtige temporale Teil der Hornhaut ist parenchymatös getrübt. Linkes Auge normal, auch ophthalmoskopisch. Spirochaetennachweis im Dunkelfeld gelingt weder von der infiltrierten Plika noch vom Geschabsel des Hornhautbelages. Am selben Tage wird das erkrankte Auge enukleiert. Es zeigt sich, daß die Iris geschwellt und faltig ist, in der vorderen Augenkammer befindet sich 1 *mm* hohes Hypopyon, darüber ein kleiner Blutrest. Nach der Enukleation wird die obere Hornhauthälfte abgetragen, der abgetragene Teil in 3 Stücke zerlegt, von denen 2 in erstarrtes Pferdeserum versenkt werden und eins zwecks Levaditifärbung in 10% Formol

gebracht wird. Auch das obere Lid mitsamt der Plika wird exzidiert, ein kleines Stück der Plika wird in Pferdeserum versenkt. 12./II. Eitrige Sekretion aus den Nasenlöchern, kleine Rhagaden am Introitus nasi beiderseits, im Dunkelfeldpräparat von den Rhagaden Spirochaeten —. 14./II. Tot im Stall. 15./II. Die Obduktion liefert keinen Befund an den inneren Organen. 1./III. Weder die Kultur der Hornhautstückchen noch die des Stückchens der Plika hat Spirochaetenwachstum gezeitigt. In Schnittpräparaten des nach Levaditi behandelten Hornhautstückchens Spirochaeten —.

Die Wassermannsche Reaktion (nach Blumenthal) war am 14./IX. 1911, 15./XII. 1911 und 7./II. 1912 negativ.

Kaninchen 66. Weiblich.

14./VI. 1911. Injektion von 1 *ccm* spirochaetenreicher Mischkultur (Stamm 120 zweite Generation) verdünnt mit 1 *ccm* physiologischer Kochsalzlösung in die rechte Carotis communis. Während der ersten 3 Monate nach der Impfung wurden am Augenhintergrund rechterseits verschiedene Veränderungen gefunden, deren Deutung noch nicht feststeht; an Haut und sichtbaren Schleimhäuten fand sich zunächst nichts. Am 11./IX. wurde folgender Befund erhoben: Bisher, abgesehen von einer gewissen Abmagerung, nichts patholgisches an dem Tier bemerkt. Heute Morgen liegt es auf der Seite, vermag sich nicht aufrecht zu erhalten. Lähmung aller Extremitäten, Sensibilität erhalten, Reflexe eher etwas gesteigert, dann und wann krampfartige Zuckungen. Incontinentia urinae et albi. Bisweilen ausgesprochener Krampf der vorderen Extremitäten, Nackensteifigkeit bei Rückwärtsbewegung des Kopfes. Auf der Bauchhaut findet sich ein kleinhandtellergroßer papulo-pustulöser, serpiginös ausgebreiteter Herd. Am Oberschenkel der rechten Vorderpfote ein pflaumengroßer Tumor mit käsigem zentralen Zerfall. Die Pupillen sind mittelweit, reagieren schlecht auf Licht (wie häufig bei Kaninchen). Im Krampfanfall, der dem am selben Tage erfolgenden Tod vorangeht, werden die Pupillen ganz weit. Ophthalmoskopisch keine Veränderung. Die von Herrn Dr. Stadler vom Pathol. Institut zu Halle a. S. ausgeführte Sektion ergab folgendes: Korrespondierend zu der veränderten Hautstelle am Bauch findet sich an den Bauchdecken schmierig-eitrige Beschaffenheit. Peritoneum glatt und glänzend. Keine Lymphdrüsenschwellung. In den Lungen zahlreiche graugelbe, stecknadelknopf- bis hirsekorngroße embolische Herde. Herzmuskel etwas schlaff, Klappen o. B., Leber o. B. Nieren: an der linken, in der Nähe des Hilus eine Hämorrhagie. Rinde beiderseits etwas trübe, Nierenbecken mit sulziger Masse angefüllt. Im Magen und Darm sehr zahlreiche kleine Blutungen. Im Dünndarm ein größeres Geschwür; Plaques o. B., Nebennieren und Milz o. B., desgleichen Gehirn und Rückenmark.

Die histologische Untersuchung des rechten Bulbus (Priv.-Dozent Igersheimer) zeigte in Serienschnitten keine Herde, nur Zellveränderungen, vor allem homogenisierte Zellen in größerer Zahl in der inneren Körnerschicht (postmortale Veränderungen?).

Die Untersuchung der Randpartien des Hautherdes der Bauchhaut nach Levaditi ergab positiven Spirochaeten-Befund. In den inneren Organen konnten keine Spirochaeten nachgewiesen werden.

Kaninchen 68. Junges männliches Tier.

14./VI. 1911. Mit $^1/_2$ *ccm* sehr spirochaetenreicher Kultur 120, zweite Generation, in die rechte Carotis communis geimpft. Kollaps. 1./IX. Auf der Skrotalhaut über dem linken Hoden eine zehnpfennigstückgroße dicke braunrote Kruste, nach deren Entfernung ein Ulkus mit leicht wallartig verdickten Rändern erscheint. Bei der Palpation stellt sich der ganze Prozeß als ein kirschgroßer Tumor dar, der mit dem unteren Pol des darunterliegenden Hodens fest verlötet ist. Im Giemsapräparat vom Rand des Ulkus: Spirochaeten +. Regionäre Lymphdrüsen nicht geschwollen. 6./IX. Exitus. Bei der Obduktion findet sich eine Periorchitis diffussa syphilitica des linken Hodens, sonst kein Befund an inneren Organen.

Kaninchen 80. Ausgewachsenes Tier.

20./VI. 1911. Mit 1 *ccm* Kultur 137 intraarteriell wie Kaninchen 68 geimpft. 7./VII. Starke Abmagerung, struppiges Aussehen. 13./VII. Haarausfall schreitet fort. 15./VIII. Behaarung kehrt wieder. 4./IX. In Summa 3 Paronychien, je eine am Daumen der Vorderpfoten, eine an der Mittelzehe der linken Hinterpfote. Charakteristisches klinisches Bild, entzündliche derbe Schwellung um den ganzen Nagel herum. Im Dunkelfeld keine sicheren Pallidae, im Giemsaausstrich Spirochaetae pallidae +. Auf der Mitte der Unterseite der linken Hinterpfote kondylomähnliches, 2 *cm* langes, 1 *cm* breites Infiltrat. 8./IX. Exitus. In Schnittpräparaten des Kondyloms (Silberimprägnierung nach Levaditi) vereinzelte Spirochaeten. Paronychie der linken Hinterpfote zeigt Fig. 5 auf Tafel VII.

Kaninchen 81. Weiblich.

20./VI. 1911. Mit 0·5 *ccm* sehr spirochaetenreicher Mischkultur 137, erste Generation, mit der gleichen Menge Kochsalzlösung verdünnt, in die rechte Carotis communis geimpft. Bis Mitte Dezember 1911 keine Erscheinungen. Die Wassermannsche Reaktion war am 19./IX. 1911 negativ gewesen.

11./XII. 1911. Mit $^3/_4$ *ccm* Mischkultur, Stamm E. zweite Generation (aus einem tertiärsyphilitischen Prozeß gewonnen, s. pag. 256) im Verhältnis 1:4 mit NaCl-Lösung verdünnt in die linke Carotis communis geimpft. 22./XII. Wassermannsche Reaktion positiv. 15./I. 1912. Ausgedehntes, oberflächlich ulzeriertes Infiltrat auf der linken Seite des Kreuzbeins dicht an der Schwanzwurzel. Das linke untere Augenlid ist samt Konjunktiva ektropioniert; entsprechend der Mitte dieses Lides ein mit kleiner Kruste bedecktes Infiltrat. Das Tier macht einen sehr hinfälligen Eindruck. 16./I. Das Infiltrat am linken unteren Augenlid ist größer geworden, im Dunkelfeld zeigen Abstrichpräparate sichere Spirochaetae pallidae in sehr großer Menge. Das Tier liegt auf der Seite und schreit bei jeder Berührung. Am selben Tage Exitus.

Kaninchen 111.

24./X. 1911. Mit 0·75 *ccm* Mischkultur im Verhältnis 1 : 3 mit Kochsalzlösung verdünnt, in die rechte Carotis communis geimpft. 10./XI. Keine Erscheinungen, W. R positiv. 5./XII. Skrotalhaut über dem rechten Hoden gut linsengroß geschwürig zerfallen, mit dicker Kruste bedeckt, der darunter liegende Hoden ist stark verdickt und scheint mit dem Ulkus im Zusammenhang zu stehen. 22./XII. W. R. positiv. 2./I. 1912. Ulzeriertes Infiltrat auf der Adduktorengend des Oberschenkels der rechten Hinterpfote und kirschgroßer, etwas fluktuierender Tumor auf der Beugeseite desselben Oberschenkels. Spirochaetennachweis gelingt weder im Dunkelfeld noch im Giemsapräparat. 6./I. Rechter Hoden operativ entfernt. Typische Periorchitis diffusa syphilitica. Von Stückchen der schwielig verdickten Hodenhüllen werden 10 Kulturen in erstarrtem Pferdeserum angelegt. 10./I. Aus der linken Nasenöffnung entleert sich etwas eitriges Sekret. (Spirochaeten —.) Starker Haarausfall. 22./I. In sämtlichen 12 Kulturröhrchen charakteristische Verflüssigung unter Verbreitung des schwefelwasserstoffähnlichen fauligen Geruchs. Im Dunkelfeld reichlich Pallidae vermischt mit anderen Keimen. (Vergl. auch pag. 265.)

Makakus rhesus. Großes ausgewachsenes männliches Tier. Das Tier wurde zuerst vor etwa 4 Jahren von Herrn Prof. Grouven mit menschlichem Luesmaterial an einer Augenbraue geimpft, ohne jedoch jemals Erscheinungen gezeigt zu haben. Bei der Impfung mit Kulturspirochaeten war nichts an dem Tier zu finden, im besonderen bestand auch keine Drüsenschwellung.

29./VI. 1911. Injektion von 1 *ccm* spirochaetenreicher Mischkultur, Stamm 120, vierte Generation, in das Parenchym des rechten Hodens. 2./VII. Geimpfter Hoden bisher unverändert. 7./VII. Rechter Hoden heute fast doppelt so groß wie der linke. Die Einstichstelle der Haut ist nicht wiederzufinden. Der geimpfte Hoden scheint auf Druck nicht schmerzhaft zu sein. 30./VII. Rechter Hoden noch stark vergrößert. 1./XI. Beide Hoden von gleicher Größe, der rechte fühlt sich jedoch härter an. In beiden Leisten — links mehr als rechts — zahlreiche geschwollene Lymphdrüsen bis zu Pflaumenkerngröße. Auf der Haut des Tieres keine Veränderungen. 4./XI. Exstirpation mehrerer Lymphdrüsen der linken Leiste. Der Drüsenquetschsaft zeigt nur in einem von 4 Dunkelfeldpräparaten einzelne Pallidae, im gefärbten Ausstrich nach Giemsa gelingt der Spirochaetennachweis leichter. Von Drüsenstückchen werden 4 Kulturen in erstarrtem Pferdeserum angelegt. 28./XI. In 3 Kulturröhrchen, die weder Verflüssigung zeigen, noch den bekannten Geruch verbreiten, keine Spirochaeten zu finden; dagegen enthält das 4., wenig verflüssigte, aber penetrant riechende Röhrchen reichlich typische, lebhaft bewegliche Pallidae. 19./III. 1912. Lymphdrüsenschwellung in der rechten Leiste unverändert, auch in der linken Leiste noch vergrößerte Drüsen zu fühlen. Haut und sichtbare Schleimhäute frei von Erscheinungen.

Durch Impfung von Pallidamischkulturen wurden also bei diesen 10 Tieren (9 Kaninchen und 1 Makakus rhesus) klinisch

luetische Allgemeinerscheinungen gewonnen, in deren Produkten wiederum Spirochaetae pallidae nachzuweisen waren. Bei den 9 Kaninchen war das Virus unmittelbar bzw. mittelbar (Leberimpfung) dem Blutkreislauf einverleibt worden, die Erzeugung eines Primäraffekts wurde dadurch übergangen. Bei dem Makaken kam es zunächst zu einer örtlichen Haftung des Impfmaterials im Hoden, die sich klinisch als Orchitis bzw. Periorchitis dokumentierte, und von dort aus zu einer Generalisation der Lues.

Das Impfmaterial entstammte 5 mal einer ersten, 4 mal einer zweiten und 1 mal einer vierten Kulturgeneration.

Die Inkubationszeit oder richtiger die Zeit, bis der Beobachter luetische Veränderungen nachweisen konnte, schwankte in ziemlich weiten Grenzen. In einem Falle (Kan. 57) wurden bereits 18 Tage nach intrakardialer Impfung luetische spirochaetenhaltige Manifestationen festgestellt, in 2 Fällen (Kan. 55 und 81) nach etwa 1 Monat, 4 mal (Kan. 53, 68, 80, 111) nach 2 bis $2^1/_2$ Monaten und 2 mal (Kan. 51 und 66) nach 3 Monaten. Die Inkubationszeit bis zum Auftreten von Allgemeinerscheinungen währte endlich bei dem Makaken 121 Tage.

Die mit Kulturspirochaeten erzeugten Erscheinungen sind im wesentlichen dieselben, wie sie mit luetischem menschlichen oder tierischen Material hervorgerufen werden, und zwar: bemerkenswerte Abnahme der Körperkräfte und Haarausfall, papulöse und papulo-ulzeröse Syphilide, Drüsenschwellung, Paronychien, Keratitis, Orchitiden und Periorchitiden. Ausgesprochene Nasentumoren (wie Uhlenhuth und Mulzer) haben wir nie beobachtet, wohl aber eitrige Sekretion aus den Nasenlöchern; auch Schwanztumoren in der von Uhlenhuth und Mulzer geschilderten Form sahen wir nicht. Vielleicht ist jedoch das bei Kaninchen 81 erwähnte oberflächlich ulzerierte starke Infiltrat an der Schwanzwurzel mit einer solchen luetischen Manifestation identisch.

Die von uns bei Kaninchen 53 beobachtete, auf hämatogenem Wege entstandene spezifische Iritis ist als eine bei der experimentellen Tiersyphilis noch nie beobachtete luetische Erscheinung besonders hervorzuheben. Einen zweiten Fall von klinisch luetischer Iritis hat kürzlich Igersheimer bei einem mit von mir

gezüchteten Kulturspirochaeten in die Karotis geimpften Kaninchen feststellen können.[1])

Die luetischen Erscheinungen bildeten sich bei den Versuchstieren, die nicht infolge der Impfung bald eingingen, spontan und schließlich vollständig zurück. Bei Kaninchen 51 wurde allerdings die Rückbildung der ersten Allgemeinerscheinungen durch Injektion eines aus meinen Kulturen hergestellten Vakzins (Prof. Dr. Grouven) zweifellos zum mindesten sehr beschleunigt. Das Tier bekam jedoch nach $2^1/_2$ Monaten ein Rezidiv. Rezidive traten außerdem bei den Tieren 53 (nach 7 Wochen) und 57 (nach 8 Monaten) auf.

Der in den Hoden geimpfte Makakus rhesus war 4 Jahre vorher von Herrn Prof. Grouven kutan an einer Augenbraue mit luetischem Substrat vom Menschen geimpft worden, ohne einen deutlichen Initialaffekt zu bekommen, und ohne daß während der 4 Jahre luetische Erscheinungen irgendwelcher Art gesehen wurden. Zur Zeit der Impfung mit Kulturspirochaeten war im besonderen — wie bereits in der Krankengeschichte erwähnt — keine Drüsenschwellung bei dem Tier nachweisbar. Erst im Anschluß an die Injektion in den Hoden entwickelte sich eine beiderseitige Scleradenitis inguinalis multiplex mit positivem Spirochaetenbefund. Ich bin deshalb überzeugt, daß der Makake nicht latent luetisch war, sondern seine Syphilis allein durch die Kulturimpfung bekommen hat.

Ich verfüge über eine Reihe von Beobachtungen, bei denen die Versuchstiere (Kaninchen) klinisch luetische Erscheinungen aufwiesen, in deren Produkten jedoch der Spirochaetennachweis weder nach den üblichen Methoden noch mittels des Kulturverfahrens gelang. Nur der positive Ausfall der Wassermannschen Reaktion wäre bei einigen dieser Tiere zugunsten der Lues vielleicht verwertbar. Die diagnostische Brauchbarkeit der Wassermannschen Reaktion beim Kaninchen ist bisher mit Recht bezweifelt worden. Nach den Feststellungen von Fleischmann, Fischer und Franz

[1]) Nachtrag bei der Korrektur: Inzwischen ist es noch zweimal gelungen, durch Impfung einer von mir gewonnenen **Reinkultur** in die Carotis communio (Dr. Igersheimer) bei Kaninchen eine Iritis papulosa bzw. Iritis papulosa + Keratitis parenchymatosa zu erzeugen.

Blumenthal zeigen Kaninchen (und Affen) auch im Normalzustand manchmal eine positive Wassermannsche Reaktion, die in kurzer Zeit ohne nachweisbare Ursache in eine negative übergehen kann und umgekehrt. Eine Erklärung konnte für dieses Phänomen bisher nicht erbracht werden. Zunächst schien deshalb bei der experimentellen Tiersyphilis dieses sonst so wertvolle diagnostische Hilfsmittel unbrauchbar und alle Berichte, in denen die Wassermannsche Reaktion bei den genannten Versuchstieren verwertet wurde, mußten völlig berechtigten Zweifeln begegnen. „Die große Bedeutung, die die Serodiagnostik der Syphilis bei Kaninchen für die Lösung einer Anzahl Fragen der experimentellen Syphilisforschung hätte", veranlaßte nun Franz Blumenthal und Fritz M. Meyer, die Frage der Wassermannschen Reaktion beim Kaninchen nochmals eingehend zu studieren und nach einer Versuchsanordnung zu suchen, „bei der sämtliche Normalkaninchen negativ und die syphilitischen positiv reagieren".

Blumenthal und Meyer bedienten sich bei ihren Versuchen der alten Wassermannschen Methode. Als Antigen verwandten sie alkoholischen syphilitischen Leberextrakt, in einzelnen Fällen normalen Herzextrakt. Sie arbeiteten stets mit inaktivierten Seren und mit halber Menge aller Komponenten (nach Sachs-Altmann). Es wurde nun festgestellt, daß sämtliche Normalkaninchen keine Wassermannsche Reaktion geben, wenn die Extraktmenge auf die Hälfte verringert und nur ein Viertel der üblichen Serummenge angesetzt wird. Mit derselben Versuchsanordnung prüften die Autoren darauf mit syphilitischem Virus infizierte Kaninchen. Es fand sich ein Unterschied zwischen solchen Tieren, die in die vordere Augenkammer und in den Hoden geimpft waren, und entsprechend der regulären Beobachtung bei diesen Impfmethoden nur eine örtliche Haftung des Kontagiums aufwiesen. Diese Tiere reagierten sämtlich nach Wassermann negativ. Anders verhielten sich intravenös und intrakardial geimpfte Tiere. Von 25 so infizierten Kaninchen hatten 10 im Laufe der Zeit Erscheinungen allgemeiner Lues gezeigt; 5 mal fand sich eine stark positive Reaktion. Von den positiv reagierenden Tieren wiesen 3 noch Erscheinungen auf, 2 waren davon frei.

Blumenthal zieht aus seinen Untersuchungen zunächst vorsichtig das Fazit: „daß, ebenso wie beim Menschen, beim Kaninchen bei allgemeiner Infektion mit Syphilis eine positive Wassermannsche Reaktion auftreten kann".

Nach Blumenthals Methode prüfte ich mein gesamtes Tiermaterial wiederholt auf das Vorhandensein der Wassermannschen Reaktion. Abgesehen von den Kontrollen stellte sich der eigentliche Versuch folgendermaßen dar:

Extrakt[1])	0·85% NaCl-Lösung	Serum	0·85% NaCl-Lösung	Komplement 1 : 10		4fach kompl. lösende hämol. Ambozeptorlösung	5%ige Hammelblutkörperchenaufschwemmung
0·05	0·45	0·025	0·475	0·5	1 Stunde im Brutschrank	0·5	0·5

Ich stellte bei 51 Kaninchen insgesamt 94 mal die Wassermannsche Reaktion an. Zunächst konnte ich bestätigen, daß 22 normale Tiere bei dieser Versuchsanordnung stets negativ reagierten. Es war jedoch nötig, daß die Seren sofort inaktiviert und am selben Tage untersucht wurden. Wenn ich inaktivierte Seren normaler Kaninchen nur 24 Stunden im Frigo aufbewahrte, erhielt ich bisweilen dennoch eine positive Reaktion.

Von den übrigen 29 Kaninchen waren geimpft:

a) in die Blutbahn 22
b) in den Hoden 4
c) in die vordere Augenkammer, bzw. in die Iris (Igersheimer) 3

ad *a*) Es zeigten im Laufe der Beobachtung sicher luetische spirochaetenhaltige Erscheinungen und reagierten:

positiv: 3,
negativ: 2,

klinisch suspekte Erscheinungen und reagierten:

positiv: 11,
negativ: 2,

[1]) Die wirksame Dosis sei 0·2 *ccm*.

keine Erscheinungen und reagierten:

posisiv: 2,

negativ: 2.

ad *b*) 2 Tiere gaben bei klinisch suspekten Erscheinungen positive, 2 Tiere mit klinischer Orchitis negative Reaktion. Diese beiden Tiere wurden später in die Carotis geimpft und gaben dann erst eine positive Blutreaktion.

ad *c*) Die Impfung in die vordere Augenkammer und eine Irisimpfung führten nicht zu einer Hemmung der Hämolyse im Wassermannschen Versuch, eine Irisimpfung hatte dagegen eine positive Seroreaktion zur Folge.

Bei den geimpften Tieren schlug die Reaktion ohne ersichtliche Ursache in 3 Fällen von positiv in negativ, ebenfalls in 3 Fällen von negativ in positiv um, und wiederum in 3 Fällen wechselte sie mehrmals zwischen positiv und negativ.

Auffallend ist die Tatsache, daß bei 11 in die Blutbahn geimpften Tieren, welche die mannigfachsten, klinisch luetisch-hochverdächtigen Veränderungen aufwiesen, in denen aber sonderbarerweise keine sicheren Spirochaeten nachzuweisen waren, eine positive Blutreaktion gefunden wurde. Auch der klinische Befund bei den beiden in den Hoden geimpften Tieren mit positiver Wassermannscher Reaktion ist so charakteristisch für Lues, daß der Kenner der Tiersyphilis wohl schon allein auf Grund des objektiven Befundes die Diagnose Syphilis stellen würde. Das eine dieser Tiere (Kan. 65) war am 3. Juni 1911 mit 2 *ccm* Stamm 122 zweite Generation in den rechten Hoden geimpft worden. Es entwickelte sich an der Einstichstelle der Skrotalhaut ein markstückgroßes hartes Geschwür, wie ich es von Hodenimpfungen mit menschlichem Material durch Prof. Grouven kannte; der Hoden selbst war gleichzeitig stark verdickt. 3 Wochen nach der Impfung zeigte sich an der Glans penis ein linsengroßes flaches Ulkus (zerfallene Papel?). Am 11. September 1911 Orchitis circumscripta dextra, am 23. Oktober 1911 erbsengroßes Infiltrat auch im linken, nicht geimpften Hoden. Mitte Dezember 1911 Exitus unter Konvulsionen. Der Spirochaetennachweis gelang trotz wiederholter Bemühungen aus keiner der Manifestationen.

Das 2. Tier (Kan. 82) war mit einer aus tertiärem Produkt gewonnenen Mischkultur in den rechten Hoden geimpft worden und zeigte nach 48 Tagen ein starkes Infiltrat im linken Hoden, Haarausfall und Abmagerung.

Wenn bei der menschlichen Syphilis bei luesverdächtigen Erscheinungen, von denen der Spirochaetennachweis nicht gelingt oder überhaupt nicht ausführbar ist, auch die Anamnese die Diagnose nicht stützt, eine positive Seroreaktion nach Wassermann gefunden wird, so hegen wir keinen Zweifel an der Lues und richten unser therapeutisches Handeln entsprechend ein. Die positive Wassermannsche Reaktion beim Kaninchen möchte ich vorläufig noch keinesfalls so hoch bewerten und deshalb auch die erwähnten 11 Tiere mit suspekten Erscheinungen nicht bedingungslos zu den mit Kulturspirochaeten luetisch gemachten Tieren rechnen.

L. Halberstädter hat kürzlich in einer Arbeit „Die Wassermannsche Reaktion beim Kaninchen“ das sonderbare Phänomen der positiven Seroreaktion normaler Tiere auf Grund seiner eigenen Beobachtungen eingehend gewürdigt und ist zu folgenden Schlüssen gekommen: Das Serum der meisten normalen Kaninchen gibt, in inaktiviertem Zustande untersucht, eine positive W. R. (Hierbei handelt es sich aber nicht um die Blumenthalsche Versuchsanordnung.) Im frischen aktiven Zustand geben die Sera normaler Kaninchen fast immer negative Reaktion, bisweilen geringe Hemmung der Hämolyse, aber nie ausgesprochene positive Reaktion. Bei mit Dourine infizierten Kaninchen gibt das Serum auch in aktivem Zustande eine positive Reaktion. Untersuchungen bei allgemein luetischen Kaninchen hat Halberstädter nicht angestellt.

Die Bedeutung der von mir geschilderten erfolgreichen Tierimpfungen mit Kulturspirochaeten erblicke ich darin, daß:

1. durch Erzeugung einer durch Spirochaetennachweis sichergestellten Allgemeinlues beim Versuchstier die Identität künstlich gezüchteter Spirochaeten mit echten Syphilisspirochaeten nachgewiesen wurde und daß

2. durch diese Impferfolge die von verschiedenster Seite vermutete Avirulenz der Kulturspirochaeten widerlegt werden konnte.

Nach mir ist es kürzlich Tomasczewski gelungen, durch Injektion von Mischkulturen in die Blutbahn eine sichere Allgemeinsyphilis zu erzeugen. T. spritzte 5 *ccm* einer Mischkultur 4. Generation in die Ohrvene eines Kaninchenbocks und erhielt bereits nach 23 Tagen eine erodierte Papel am Präputium mit positivem Spirochaetenbefund.

Daß es sich bei Tomasczewskis und meinen Versuchen um die Verwendung unreinen Impfmaterials handelt, wird kaum ein Grund sein, den endgültigen Beweis für die ätiologische Beziehung der Spirochaete pallida zur Syphilis als nicht erbracht anzusehen. Impfversuche mit reinen Kulturspirochaeten sind von mir in die Wege geleitet, haben aber bei der Kürze der Zeit noch zu keinem referierbaren Resultat geführt. In der Literatur existieren bisher nur Mitteilungen über Tierimpfungen mit Reinkulturen von Noguchi und W. H Hoffmann, denen es gelang eine örtliche Haftung im Hoden zu erzielen. Noguchi vermochte mit seinem ersten reinen Stamm bei 2 von 8 Kaninchen und mit dem 2. bei 3 von 4 Kaninchen durch Injektion in den Hoden eine spirochaetenhaltige Orchitis zu erzeugen. W. H. Hoffmann impfte 2 Kaninchen mit Reinkulturen, die er aus menschlichem Material gewonnen hatte, und ebenfalls mit dem Erfolg einer spirochaetenhaltigen Orchitis. Stückchen des erkrankten Hodens konnte er außerdem auf Pferdeserum erfolgreich zurückimpfen.

Aufgabe meiner eigenen weiteren Versuche wird es sein, mit Reinkulturen eine Allgemeinlues, die ich für beweiskräftiger halte, zu erzielen.

Literatur.

Arnheim. Kulturversuche der Spiroch. pall. Berliner klin. Woch. 1909. Nr. 26. p. 1131.

Blumenthal, Franz. Die Serodiagnostik der Syphilis. D. Z. 1910. Heft 1 und 2.

— Wassermannsche Reaktion und experimentelle Kaninchensyphilis. Berliner klin. Woch. 1911. Nr. 32. p. 1462.

— Die experimentelle Syphilisforschung. Aus: „Ergebnisse der wissenschaftlichen Medizin". 1911.

Bruckner, J. und Galasesco: Orchite syphilitique chez le lapin par cultures impures de spirochètes. Réun. biol. Bucarest. C. r. Soc. biol. Bd. LXVIII. 1910. p. 684.

Doutrelepont und Grouven. Über den Nachweis von Sp. p. in tertiär-syphilitischen Produkten. Deutsche mediz. Wochenschrift. 1906. Nr. 23. p. 909.

— Mikroskopische Präparate von Spiroch. pall. bei tertiärer Lues. Deutsche med. Woch. 1907. Nr. 16. p. 659.

Grouven, C. cf. Doutrelepont.

— Spirochaeten im Ausstrich- und Schnittpräparat. Deutsche med. Woch. 1907. Nr. 31. p. 1280.

— Vakzinationsversuche beim syphilitischen Kaninchen. Deutsche med. Woch. 1911. Nr. 36.

Halberstaedter, L. Die Wassermannsche Reaktion beim Kaninchen. Berliner klin. Woch. 1912. Nr. 13.

Hoffmann, W. H. Die neuesten Fortschritte in der Erforschung des Syphiliserregers. Berliner klin. Woch. 1910. Nr. 1.

— Reinzüchtung der Sp. p. Zeitschr. f. Hyg. Bd. LXVIII. H. 1.

— Die Reinzüchtung der Sp. p. Berliner klin. Wochenschr. 1911. Nr. 48. p. 2160.

— Die Übertragung der Syphilis auf Kaninchen mittels reingezüchteter Spirochaeten vom Menschen. Deutsche mediz. Wochenschrift. 1911. Nr. 34. p. 1546.

Hoffmann, Erich, s. Schaudinn, F.

— Die Ätiologie der Syphilis. Mit 2 Taf. Berlin 1906. J. Springer.

— Die Ätiologie der Syphilis nach dem gegenwärtigen Stand unserer Kenntnisse. Verhandl. der deutschen derm. Gesellsch. IX. Kongreß. Berlin 1907. I. Teil. p. 115—223.

— Über die Benennung des Syphiliserregers nebst Bemerkungen über seine Stellung im System. Münch. med. Woch. 1911. Nr. 33. p. 1769.

— Bericht über neuere Versuche, die Spir. pall. rein zu züchten und auf Tiere zu übertragen. Sitzungsber. Niederrhein. Gesellschaft für Natur- und Heilkunde in Bonn. 23./X. 1911.

— Ätiologie der Syphilis. Handbuch der Geschlechtskrankheiten. Herausgegeben von Finger, Jadassohn, Ehrmann u. Gross. Bd. II. Verlag Alfred Hölder. 1912.

Igersheimer, J. Demonstration zur experimentellen Syphilis. Bericht über die Versammlung der ophthalmologischen Gesellsch. Heidelberg 1911. p. 364.

Levaditi, C. et Stanesco. Culture de deux spirochètes de l'homme (Sp. gracilis et Sp. balanitidis). C. r. Soc. biol. Bd. LXVII. Juli 1909.

Malinowski, F. Sp. pall. in tertiärer Syphilis. Russ. Zeitschrift f. Derm. u. Venereol. 1907. Nr. 2. Ref. Monatsh. f. prakt. Dermatologie. Bd. XLIV. p. 433.

Mühlens, P. Über Züchtung von Zahnspirochaeten etc. Deutsche med. Woch. 1906. Nr. 20. p. 797.

— Untersuchungen über Sp. p. und einige andere Spirochaetenarten, insbesondere in Schnitten. Zentralbl. f. Bakt. Original. Bd. XLIII. Heft 6 und 7.

— Vergleichende Spirochaetenstudien. Zeitschrift f. Hyg. und Inf. 1907. Bd. LVII.

— Disk.-Bemerk. zu den Vorträgen von Blaschko und Benda. Berl. klin. Woch. 1907. Nr. 9. p. 258 und Nr. 12. p. 351.

— Reinzüchtung einer Spirochaete (Sp. p.?) aus einer syphilitischen Drüse. Deutsche med. Woch. 1909. p. 1261.

— Über Züchtungsversuche der Sp. p. und Sp. refringens sowie Tierversuche mit den kultivierten Spirochaeten. Kl. Jahrb. 1910. Bd. XXIII.

— und Löhe. Über Züchtungsversuche der Sp. p. Zentralblatt f. Bakt. Orig. Bd. XLVII. Aug. 1908.

Mulzer, P. cf. Uhlenhuth.

— Die tierexperimentelle Syphilisforschung und ihre Bedeutung für die Erkennung und Behandlung der Syphilis. Arch. f. Dermatologie u. Syphilis. CXI. Bd. 2. Heft. 1912.

Neisser, A. Die experimentelle Syphilisforschung. Berlin. J. Springer. 1906. Monogr.

— Über den derzeitigen Stand der experimentellen Syphilisforschung. Verh. d. deutschen derm. Ges. IX. Kongr. Bern 1906.

— Ein Beitrag zur Lehre von der Kaninchensyphilis. D. Z. 1908. Heft 2. p. 73.

— Bericht über die in Batavia und Breslau ausgeführten Arbeiten zur Erforschung der Syphilis. Berlin, J. Springer. 1911. (Arbeiten aus d. Kaiserl. Gesundheitsamt. Bd. XXXVII.)

Noguchi, H. Reinkulturen von Sp. p. Journ. of Amer. med. Assoc. 1911. 8. Juli u. Münch. med. Woch. 1911. Nr. 29. p. 1550.

— Über die Gewinnung der Reinkulturen von pathogenen Sp. p. und Sp. pertenuis. Münch. med. Woch. 1911. Nr. 29. p. 1550.

— A method for the cultivation of pathogenic Trepon. pallid. (Sp. p.). Journ. of exper. Med. 1911. Bd. 14. Nr. 2.

— Hautallergie bei Syphilis; ihre diagnostische und prognostische Bedeutung. Münch. med. Woch. 1911. Nr. 45. p. 2372.

Schaudinn, F. Zur Kenntnis der Sp. p. Deutsche med. Woch. 1905. Nr 42 p. 1665 und Nr. 43 p. 1728.

— Zur Kenntnis der Sp. p. und anderer Spirochaeten (Nachlaß). Arb. a. d. Kais. Gesundheitsamte. 1907. Bd. XXVI. H. 1.

— und Hoffmann, E. Vorläufiger Bericht über das Vorkommen von Sp. p. in syphilitischen Krankheitsprodukten und bei Papillomen. Arb. a. d. Kais. Gesundheitsamte. Bd. XXII. p. 527.

— Über Spirochaetenbefunde im Lymphdrüsensaft Syphilitischer. Deutsche med. Woch. 1905. Nr. 18. p. 711.

— Über Sp. p. bei Syphilis und die Unterschiede dieser Form gegenüber anderen Arten dieser Gattung. Berliner klin. Woch. 1905. Nr. 22. p. 673.

Schereschewsky, J. Das Verhalten der Sp. p. (Schaudinn) bei der Giemsafärbung. Zentr.-Bl. f. Bakt. Orig. Bd. XLV. H. 1.

— Zum Nachweis der Sp. p. in Ausstrichen. Deutsche med. Woch. 1907. Nr. 12. p. 462.

— Experimentelle Beiträge zum Studium der Syphilis. Zentr.-Bl. f. Bakt. Orig. Bd. XLVII. H. 1.

— Züchtung der Sp. p. (Schaudinn). Deutsche med. Woch. 1909. p. 835.

— Weitere Mitteilungen über die Züchtung der Sp. p. Deutsche med. Woch. 1909. Nr. 29. p. 1260.

— Bisherige Erfahrungen mit der gezüchteten Sp. p. Deutsche med. Woch. 1909. Nr. 38. p. 1652.

— Erkennung des Syphiliserregers auf dem Wege der Züchtung der Sp. p. Berliner klin. Woch. 1910. Nr. 42.

— Kulturversuche der Sp. p. auf Pferdeserum. 82. Vers. deutscher Naturf. u. Ärzte. Königsberg. 1910.

— Syphilitische Allgemeinerkrankung beim Kaninchen durch intrakardiale Kulturimpfung. Deutsche med. Woch. 1911. Nr. 20. p. 929.

— Die Übertragung der Syphilis auf Kaninchen mittelst reingezüchteter Spirochaeten vom Menschen. Deutsche med. Woch. 1911. Nr. 39. p. 1798.

Syphilisübertragung durch Spirochaetenreinkultur, Rekurrens und v. Dungernsche Reaktion. V. Tagung d. fr. Vereinigung f. Mikrobiol. Dresden. Juni. 1911. Ber. d. D. m. W. 1911. Nr. 32. 1501.

Sowade, H. Syphilitische Allgemeinerkrankung beim Kaninchen durch intrakardiale Kulturimpfung. Deutsche med. Woch. 1911. Nr. 15. p. 682.

— Kulturspirochaeten und Impfversuche mit unreinen Spirochaetenkulturen. Ärztever. Halle. 4. Mai. 1911. Ber. Münch. med. Woch. Nr. 30. p. 1640.

— Über Sp. p.-Kulturimpfungen nebst Bemerkungen über die Wassermann-Reaktion beim Kaninchen. Deutsche med. Woch. 1911. Nr. 42. p. 1934.

— Eine Methode zur Reinzüchtung der Syphilisspirochaete. Deutsche med. Woch. 1911. Nr. 17.

— Reinzüchtung der Syphilisspirochaete. Ärztever. Halle. 21. Februar 1912. Ber. Münch. med. Woch. 1912. Nr. 18. p. 1015.

Tomaszewski, E. Über den Nachweis der Sp. p. bei tertiärer Syphilis. Münch. med. Woch. 1906. Nr. 27. p. 1301.

— Ein Beitrag zur Züchtung der Sp. p. Berliner klin. Woch. 1912. Nr. 17.

Uhlenhuth, P. und Mulzer, P. Die experimentelle Kaninchensyphilis mit besonderer Berücksichtigung des Hodens. Arb. a. d Kais. Gesundheitsamte. Bd. XXXIII. H. 1.

— Zur experimentellen Kaninchen- und Affensyphilis. Berliner klin. Woch. 1910. Nr. 25.

— Experimentelle Kaninchensyphilis. V. Tagung der freien Vereinigg. f. Mikrobiol. Dresden. Juni 1911. Ber. D. med. Woch. 1911. Nr. 32. p. 1501.

— Syphilitische Allgemeinerkrankung bei Kaninchen. Deutsche med. Woch. Nr. 2. p. 51.

— Über die experimentelle Impfsyphilis der Kaninchen. Sitzungsber. d. Berl. med. Ges. 29./III. 1911. Ber. D. med. Woch. 1911. Nr. 15. p. 713.

Erklärung der Abbildungen auf Taf. VI u. VII.

Taf. VI. Fig. 1. Spirochaetae pallidae aus Reinkultur. 4. Generation. Photogramm. — Fig. 2. Haufenbildung von Spirochaetae pallidae im Dunkelfeld, am 5. Tage nach Herstellung des Präparates gezeichnet. Die hellen Teile sind fester Pferdeserumnährboden, die dunklen sind Lücken im Nährboden, in denen die Spirochaeten frei liegen.

Taf. VII. Fig. 3. Reinkultur 5. Generation. 11 Tage alt, bei durchfallendem künstlichen Licht gezeichnet. — Fig. 4. Iritis beim Kaninchen 53. Zeichnung bei Betrachtung mit dem Hornhautmikroskop. Fig. 5. Paronychie bei Kaninchen 80. — Fig. 6. Spirochaetae pallidae aus Reinkultur 3. Gen. Zeiss $^1/_{12}$ Immers. Ok. 2. Zeichnung.

Zeichnungen und Photogramme verdanke ich Fräulein Käte Wanger in Halle a. Saale.

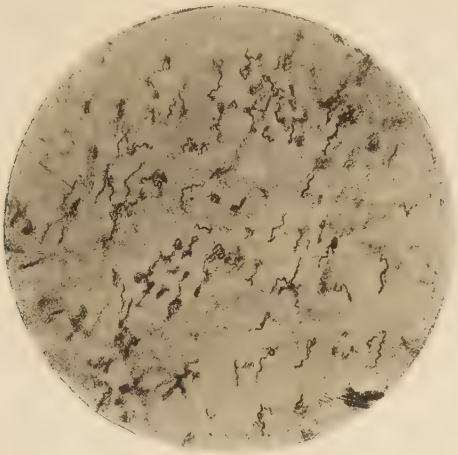

Fig. 1

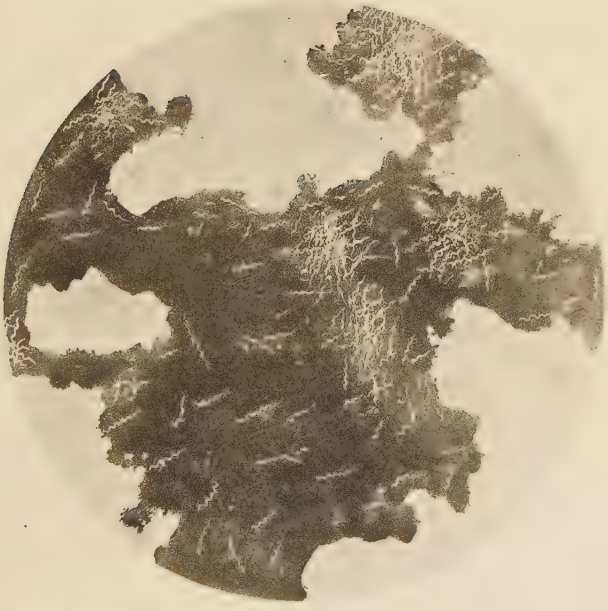

Fig. 2

Lichtdruck v. Max Jaffé, Wien.

Sowade: Kultur der Spirochaete pallida.

Fig. 3.

Fig. 4.

Fig. 5.

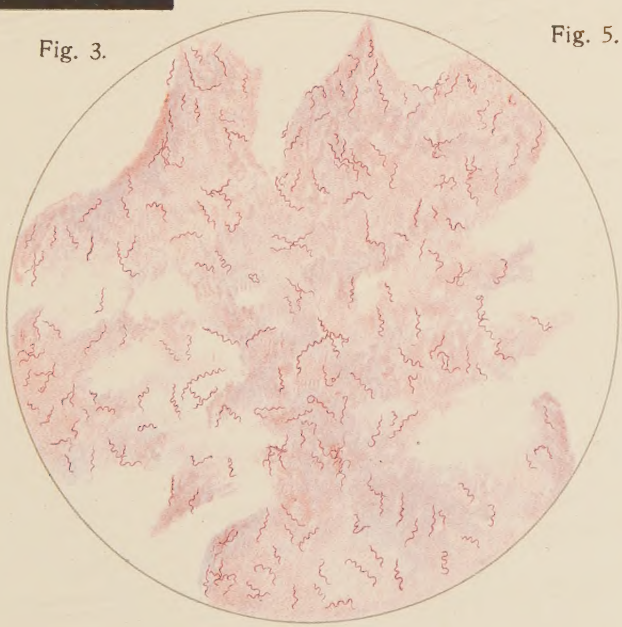

Fig. 6.

Sowade: Kultur der Spirochaete pallida.

Lith. Kunstanstalt Friedrich Sperl, Wien, III/1.

Verlag
von
WILHELM BRAUMÜLLER, k. u. k. Hof- und Univers.-Buchhändler,
Wien und Leipzig.

WIENER
KLINISCHE WOCHENSCHRIFT

unter ständiger Mitwirkung der Herren Professoren Drs.

G. Braun, O. Chiari, Rudolf Chrobak, V. R. v. Ebner, S. Exner, E. Finger, M. Gruber, F. Hochstetter, A. Kolisko, H. Meyer, J. Moeller, I. Neumann, K. v. Noorden, H. Obersteiner, R. Paltauf, Adam Politzer, G. Riehl, A. Schattenfroh, F. Schauta, C. Toldt, A. v. Vogl, J. v. Wagner, Emil Zuckerkandl.

Begründet von weil. Hofrat Prof. H. v. Bamberger.

Herausgegeben von

Anton Freih. v. Eiselsberg, Theodor Escherich, Ernst Fuchs, Julius Hochenegg, Ernst Ludwig, Edmund v. Neusser, Alfons v. Rosthorn und Anton Weichselbaum.

Organ der k. k. Gesellschaft der Aerzte in Wien.

Redigiert von Prof. Dr. Alexander Fraenkel.

Auf Wunsch liefert die Verlagshandlung Interessenten das Blatt zur genaueren Information während der Dauer eines Monats (4 Nummern hintereinander) probeweise und kostenfrei ohne irgendwelche Verpflichtung.

Die „Wiener klinische Wochenschrift“ erscheint jeden Donnerstag im Umfang von drei bis vier Bogen Groß-Quart.

Abonnementspreis jährlich 24 K — 24 Mk. und Auslandsporto. Abonnements- und Insertions-Aufträge für das In- und Ausland werden von allen Buchhandlungen und Postämtern, sowie von der Verlagshandlung übernommen.

Probenummern sind von letzterer jederzeit gratis und franko zu beziehen.

Lokalisations-Tabellen

zur

graphischen Darstellung

des

Sitzes und der Verbreitung von Krankheiten

für

Kliniken, Ärzte und Studierende.

Von

Dr. F. J. Pick,

k. k. Hofrat, o. ö. Professor und Vorstand der dermatologischen Klinik an der Universität Prag, Herausgeber des Archiv für Dermatologie und Syphilis etc.

Zweite, vermehrte und verbesserte Auflage

Inhalt:

16mal	Tafel	I.:	Menschlicher Körper, Vorderansicht.
16 „	„	II.:	„ „ Rückansicht.
8 „	„	III.:	Kopf, Vorderansicht.
7 „	„	IV.:	„ rechte und linke Seitenansicht.
3 „	„	V.:	Handfläche und Handrücken.

2 Oleaten.

Schmal-Folio.

Preis 3 K 60 h = 3 Mk.

Diese neue Ausgabe bietet mehrfache aus eigener Erfahrung des Verfassers gewonnene oder von befreundeter Seite vorgeschlagene Verbesserungen. Die Figuren sind größer, neue Figuren für solche Körperteile, wie Kopf und Hände, welche eine eingehendere Lokalisationsangabe erfordern und hiefür an den Ganzfiguren nicht genügenden Raum finden, sind hinzugekommen, die Anordnung und das Format gestatten eine leichtere Handhabung.

Durch alle Buchhandlungen zu beziehen.

K. u. k. Hofbuchdrucker A. Haase, Prag.